

**UNTERSUCHUNGEN ZUR SEQUENZ DER
AMINOSÄURERESTE 127 BIS 174
DES KALLIKREINS AUS SCHWEINEPANKREAS**

Werner Ehret

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
in der Chirurgischen Klinik der Universität München

Leiter: Prof. Dr. H. Fritz

UNTERSUCHUNGEN ZUR SEQUENZ DER AMINOSÄURERESTE 127
BIS 174 DES KALLIKREINS AUS SCHWEINEPANKREAS



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Dr.rer.nat. Werner Ehret

München

September 1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München



Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Bidlingmaier

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bethke

Dekan: Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Januar 1979

Herrn Prof. Dr. H. Fritz danke ich für die großzügige Förderung meiner Arbeit.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Dr. F. Fiedler für zahlreiche Diskussionen und wertvolle Anregungen

Weiter gilt mein Dank für wertvolle experimentelle Hilfe Frl. G. Puff und Frl. C. Hirschauer sowie Frau M. Meier für ihre Unterstützung bei den schriftlichen Arbeiten

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Stand der Forschung	1
1. Historisches zur Enzymologie des Kallikreins	1
2. Vorkommen	2
3. Eigenschaften	3
Formen	3
Zusammensetzung	4
Katalytische Wirkung	5
4. Struktur	7
Kettenzusammensetzung	7
A-Kettensequenz	13
II. Aufgabenstellung	14
III. Bisherige Aufklärung der B-Kettensequenz	14
1. Bromcyanspaltung	14
2. Tryptische Spaltung von B-CB-I	21
carboxymethyliertes Peptid	21
aminoäthyliertes Peptid	21
3. Problematik	24
IV. Neuere Ergebnisse	27
1. Aminoäthylierung	27
Reproduzierbarkeit	27
Homogenität	33

	Seite
2. Bromcyanspaltung intakten Kallikreins	47
3. Tryptische Spaltung von B-CB-I (AE)	49
Qualitativ	49
Quantitativ	50
Chromatographische Reinigung	57
B-CB-I-T-2 (AE)	57
B-CB-I-T-3 (AE)	57
B-CB-I-T-5 (AE)	60
4. Tryptische Spaltung aminoäthylierter B-Kette	67
B-T-I	68
B-T-II	71
B-T-III u. IV	75
B-T-V	76
5. BNPS-Skatol-Spaltungen	81
B-CB-I-T-I	82
B-CB-I	85
- analytisch	85
- präparativ	88
 V. Sequenzierungsergebnisse	 97
B-CB-I-T-I	97
B-CB-I-S-1	97
 VI. Homologiebeziehungen	 102
 VII. Experimentelles	 120
Reduktion und Carboxymethylierung	120
Reduktion und Aminoäthylierung	120
Bromcyanspaltungen	121
Trypsinspaltungen	121
Sonstige Spaltmethoden	121

	Seite
Aminosäureanalysen	122
Bestimmung des Proteingehalts	123
Spektrophotometrische Bestimmung des Trypto-	123
phan-Gehaltes	
Chromatographische Trennungen	123
Ninhydrindetektion	124
 VIII. Zusammenfassung	 125
 IX. Literatur	 130
 X. Abkürzungsverzeichnis	 135

I. Stand der Forschung

1. Historisches zur Enzymologie des Kallikreins

Nach der intravenösen Injektion von Harn in den Kreislauf des narkotisierten Hundes beobachtete E.K. Frey im Jahre 1925 regelmäßig einen innerhalb einiger Minuten auftretenden reversiblen Blutdruckabfall. In der Folge gelang es Frey und Kraut, die für diesen Blutdruckabfall verantwortliche Substanz als hochmolekular, thermolabil und empfindlich gegen saure und alkalische pH-Werte zu charakterisieren und damit gegen andere körpereigene kreislaufaktive Stoffe wie z.B. Acetylcholin oder Histamin abzugrenzen (1).

Die systematische Suche nach der Herkunft dieser Substanz führte Frey, Kraut und Werle zu der Erkenntnis, daß das Pankreas große Mengen davon enthalten mußte und somit als das Ursprungsorgan in Betracht gezogen werden konnte. Deshalb erhielt das untersuchte blutdrucksenkende Prinzip nach einer griechischen Bezeichnung für die Bauchspeicheldrüse den Namen Kallikrein (1).

Im Jahre 1936 gelang es Werle zu zeigen, daß das Kallikrein selbst keine pharmakologische Aktivität besitzt, vielmehr setzt dieses Enzym durch seinen Kontakt mit Serum eine Substanz frei, die ihrerseits für die Wirkungen verantwortlich ist. Neben ihrem blutdrucksenkenden Einfluß auf den Kreislauf ist diese Substanz auch in der Lage, den isolierten Hunde- oder Meerschweinchendarm sowie den Rattenuterus zu kontrahieren. Diese durch Kallikrein freigesetzte Substanz wurde von Werle als Kallidin bezeichnet (2,3).

Die Beobachtung von Frey und Kraut, daß dem Harn zugesetztes Blut - beginnend nach wenigen Minuten und vollständig nach einer Stunde - die Blutdruckwirksamkeit aufzuheben vermochte, ließ sich zwanglos mit dem Vorhandensein eines Kallikreininhibitors

im Blut erklären. Während die Wirksamkeit des Kallikreins solange erhalten bleibt, bis das Enzym durch seine Inhibitoren unwirksam gemacht wird (oder bis sein Substrat verbraucht ist), klingt die Wirkung des Kallidins, das durch enzymatische Hydrolyse abgebaut wird, wesentlich rascher ab.

1949 fand Rocha e Silva mit dem Bradykinin, das er durch Inkubation von Serum mit Trypsin oder mit Enzymen aus Schlangengift zu erhalten vermochte, eine weitere Substanz, deren Wirkung auf Blutdruck und glatte Muskulatur von Darm und Uterus jener des Kallidins ähnelt (4). Im Jahre darauf erkannte Werle, daß Kallidin und Bradykinin demselben im Serum enthaltenen Vorläufer entstammen mußten. Weitere zehn Jahre waren erforderlich, um herauszufinden, daß Kallidin und Bradykinin eine äußerst ähnliche chemische Struktur aufweisen. Bradykinin wurde als Nonapeptid folgender Struktur identifiziert: Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg (5,6).

Kallidin erwies sich als Dekapeptid der gleichen Sequenz mit einem zusätzlichen Lysinrest am Aminoterminal des Moleküls (7).

Beide Substanzen erhielten gemeinsam mit einigen weiteren ähnlichen die Sammelbezeichnung Kinine. Das Serums substrat, aus dem sich die Kinine freisetzen lassen, wurde demzufolge Kininogen genannt. Jene Enzyme, die wie Kallikrein, Trypsin oder Schlangengifthydrolasen die Kininfreisetzung bewirken, wurden als Kininogenasen, und die hydrolytischen Enzyme, die Kinine abbauen, als Kininasen bezeichnet. Die "Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry" erteilte dem Kallikrein die Systemnummer EC 3.4.21.8 .

2. Vorkommen

Außer im Harn und Pankreas wurden Kallikreine bei einer Reihe von Spezies sowohl in der gl. submandibularis als auch in der Schleimhaut des Darmes nachgewiesen (8,9). Während immunochemische Unter-

suchungen ebenso wie der Vergleich von enzymologischen Parametern sowie der Hemmbarkeit des Enzyms durch verschiedene Inhibitoren eine große Ähnlichkeit der aus dem Pankreas, der Niere, aus Harn und gl. submandibularis des Schweins isolierten Kallikreine demonstrierten (1,10), dürfte das im Serum vorkommende Kallikrein eine völlig andere Substanz sein, die mit den Organ-kallikreinen nur den Namen und eine gewisse Ähnlichkeit der Wirkung gemein hat (11,12).

Das aus dem Pankreas des Schweines isolierte Kallikrein ist das bei weitem am besten untersuchte Enzym der Kallikreingruppe. Es liegt in diesem Organ in ca. 100-fach niedrigerer Konzentration als Trypsin vor (13). So ist für die Isolierung von 1 g reinem Enzym die Aufarbeitung von ca. 100 kg Schweinepankreas erforderlich (14).

Da zur gründlichen Charakterisierung des Enzyms sowie vor allem zur Aufklärung der Aminosäuresequenz erhebliche Mengen an möglichst hoch gereinigtem Kallikrein erforderlich sind, übersteigt der für die Isolierung der benötigten Menge erforderliche technische und personelle Aufwand die Möglichkeiten eines einzelnen Forschungslabors. Für unsere im Folgenden dargestellten Untersuchungen fand deshalb stets Kallikrein Verwendung, das uns großzügigerweise aus den Laboratorien der Farbenfabriken Bayer AG durch die Herren Drs. C. Kutzbach und G. Schmidt-Kastner zur Verfügung gestellt wurde.

3. Eigenschaften

Formen

Es darf als gesichert gelten, daß Kallikrein bei seiner Biosynthese im Pankreas als inaktives Proenzym synthetisiert wird (15). Dieses wird analog anderen Enzymen dieses Organs erst bei seiner Freisetzung in das Darmlumen in die aktive Form überge-

geführt. Das noch inaktive Präkallikrein konnte - wie auch aktives Kallikrein (13) - durch Chromatographie an DEAE-Cellulose in zwei Fraktionen aufgetrennt werden.

In ähnlicher Weise hatte Habermann bei der Elektrophorese von Kallikrein, das er aus Schweinepankreasautolysat gewonnen hatte, an Stärkegelsäulen zwei Banden unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit, jedoch gleicher pharmakologischer Aktivität erhalten (16). Die rascher zur Anode wandernde Form bezeichnete er als Kallikrein A, die andere als Kallikrein B.

Die Elektrophorese bei pH 4 (17) sowie die isoelektrische Fokussierung des Kallikreins führt zu einer Auftrennung jeder der beiden Formen in mindestens fünf weitere Banden (18). Die für diese Heterogenität verantwortlichen Sialinsäuren können durch eine Behandlung mit Neuraminidase abgespalten werden; zur Vermeidung von Komplikationen durch diese zusätzliche chromatographische Heterogenität sind alle im Weiteren geschilderten Untersuchungen mit neuraminidasebehandeltem Kallikrein durchgeführt.

Zusammensetzung

Die nähere Charakterisierung der Kallikreine A und B durch Fiedler et al. führte zu der Erkenntnis, daß es sich bei beiden Formen um Glykoproteine handelt, deren unterschiedliches Verhalten ausschließlich durch den unterschiedlichen Kohlehydratgehalt beider Isoenzyme bedingt ist (Tab.1).

Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung des Kallikreins (Tab.2) beruht auf dem Wert $24\,000 \pm 860$ Dalton für den Proteinanteil des Molekulargewichts, wie er mit Hilfe der Titration des aktiven Zentrums mit pNPGB ermittelt werden konnte (19,20).

Tab.1 Durchschnittlicher Kohlehydratgehalt von neuraminidase-behandelten Kallikreinen A und B (19) (Reste pro Molekül)

	Kallikrein A	Kallikrein B
Mannose	3,3	5,7
Galactose	0,8	1,5
Fucose	0,5	1,1
Glucosamin	3,9	9,5
Gesamtkohlehydrate (Gewichts %)	5,6	11,5

Katalytische Wirkungen

Die Freisetzung des Dekapeptids Kallidin aus seinem natürlichen Substrat, dem sauren α -2-Glykoprotein Kininogen, weist auf die proteolytische Aktivität des Kallikreins hin.

Die allgemeine proteolytische Aktivität des Kallikreins z.B. im Vergleich mit jener des Trypsins beim Angriff beider Enzyme auf Casein liegt ca. um den Faktor 200 niedriger (22).

Die esterolytische und proteolytische Aktivität des Kallikreins wird durch Umsetzung mit DFP irreversibel gehemmt (23). Nach Säurehydrolyse des so entstandenen Produktes zeigte die Isolierung von Serinphosphat, daß Kallikrein in seinem aktiven Zentrum einen Serinrest aufweist (24). Da sich die Aminosäuresequenz Asp-Ser-Gly des Kallikreins im aktiven Zentrum als identisch mit den entsprechenden Sequenzen der Serinproteasen des Pankreas Trypsin, Chymotrypsin und Elastase erwies, lag der Schluß nahe, Kallikrein dieser Gruppe von Proteinasen der Bauchspeicheldrüse zuzuordnen (25).

Tab.2 Aminosäurezusammensetzung von Kallikrein und Trypsin
des Schweines

Aminosäuren	Reste pro Molekül	
	Kallikrein (19)	Trypsin (21)
Asp	28	24
Thr	15	10
Ser	14	27
Glu	23	17
Pro	16	9
Gly	22	25
Ala	13	15
Cys/2	10	12
Val	10	16,4
Met	4	2
Ile	12	15,6
Leu	20	16
Tyr	7	8
Phe	10	4
Lys	10	10
His	8	4
Arg	3	4
Trp	7	4
Summe	232	223

Ein wesentlicher Unterschied zwischen diesen als Verdauungsenzyme funktionierenden Serinproteinasen und dem Kallikrein liegt jedoch in der oben erwähnten hohen Spezifität seiner katalytischen Wirkung.

In unserem Arbeitskreis wurden von Fiedler et al. die kinetischen Konstanten für die Kallikrein-katalysierte Hydrolyse einer Reihe von Peptiden bestimmt, die den C-terminalen Teil des Bradykinins zusammen mit einigen weiteren Aminosäureresten umfassen, wie sie Habermann im Rinderkininogen fand (26). Arg-Ser ist die einzige Bindung, die dabei mit verhältnismäßig hoher Geschwindigkeit gespalten wird. Von wesentlicher Bedeutung für die Hydrolysegeschwindigkeit erwies sich ein diesem Argininrest N-terminal benachbarter Phenylalaninrest. Wird dieses Phenylalanin gegen Glycin ausgetauscht, so sinkt die Geschwindigkeit der Peptidspaltung durch Kallikrein, nicht jedoch durch Trypsin, beträchtlich.

In Übereinstimmung mit diesen Befunden stehen Untersuchungen über die Hemmbarkeit des Kallikreins durch substratanaloge Aminoacyl- bzw. Peptidylchlormethane. Während das verwandte Trypsin durch TLCK irreversibel inaktiviert wird, fehlt diese Hemmung beim Kallikrein. Jedoch führt die Umsetzung des Kallikreins mit Peptidyllysylchlormethanen zur Inaktivierung, wobei in Übereinstimmung mit der Primärspezifität dieses Enzyms Gly-Val-ArgCH₂Cl den wirksamsten Hemmstoff darstellt (27).

4. Struktur

Kettenzusammensetzung

Da Kallikrein bei einem Gehalt von 10 Cysteinresten keine freien Sulfhydrylgruppen aufweist (19), sollte das Molekül 5 Disulfidbrücken enthalten. Bei der Elektrophorese reduzierten Kallikre-

ins an SDS- und harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen fanden sich zwei Banden. Der Vergleich der Laufstrecken dieser beiden Banden mit denjenigen von Markersubstanzen ließ auf das Vorhandensein von zwei Ketten mit Molekulargewichten von ca. 10 000 bzw. 20 000 Dalton schließen (28).

In Übereinstimmung mit diesen Resultaten befinden sich die Ergebnisse der Endgruppenbestimmungen. Mit Hilfe der Cyanat- sowie der Dansylmethode ließen sich Alanin und Isoleucin als Aminoendgruppen festlegen. Die Hydrazinolyse lieferte einen Prolin- sowie jeweils einen halben Leucin- bzw. Serinrest als carboxylendständige Aminosäure.

Zur präparativen Isolierung der erwarteten beiden Polypeptidketten wurde das denaturierte Enzym mit Mercaptoäthanol reduziert. Der Schutz der dabei freigesetzten Sulfhydrylgruppen gegen die Oxidation durch Luftsauerstoff erfolgte auf zwei Arten, die den Ketten jeweils unterschiedliche Ladungseigenschaften verleihen. Zum einen wurde durch Umsetzung mit Äthylenimin die basische Aminoäthylgruppe, zum anderen durch Carboxymethylierung mit Jodessigsäure die saure Carboxymethylgruppe eingeführt.

Bei der Auftrennung des reduzierten und carboxymethylierten Kallikreins durch Gelfiltration an Sephadex G-75 ergaben sich vier UV-absorbierende Gipfel (Abb.1). Das aminoäthylierte Material lieferte ein prinzipiell gleichartiges Elutionsdiagramm (Abb.2).

Bei beiden Modifikationsarten entsprach die elektrophoretische Beweglichkeit (in Gegenwart von SDS) des jeweils ersten Gipfels der Abb.1 und 2 der der kleineren Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht um 10 000, diejenige des zweiten Gipfels der größeren Kette mit einem Molekulargewicht um 20 000 Dalton.

In Übereinstimmung damit befand sich das Ergebnis der Aminosäureanalysen beider Fraktionen. Basierend auf einem Arginin-

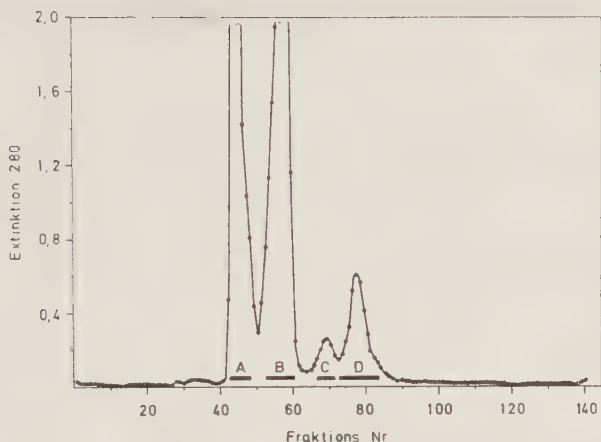


Abb.1 Trennung der Fragmente reduzierten und carboxymethylierten Kallikreins (94,4 mg) durch Gelfiltration an Sephadex G-75 (200 x 2 cm). Die Säule war mit 0,1 M NH_4HCO_3 (pH 7) äquilibriert und wurde mit ca. 15 ml/h betrieben, Fraktionen mit 3,8 ml wurden gesammelt.

gehalt von zwei Resten in der kleineren der beiden Ketten, der A-Kette, konnte das Molekulargewicht des Proteinanteils dieser Kette je nach C-terminalem Serin- bzw. Leucingehalt (s.o.) zu 9 026 bzw. 9 113 Dalton bestimmt werden (Tab.3).

Die Aminosäurezusammensetzung der größeren der beiden Ketten, der B-Kette, ließ auf einen Gehalt von 152 Resten schließen (Tab.3).

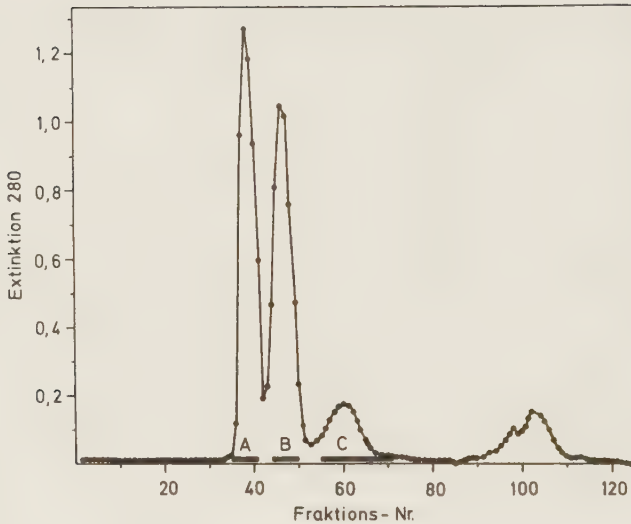


Abb.2 Trennung der Fragmente reduzierten und amino-
äthylierten Kallikreins ($0,89 \mu\text{Mol}$) durch
Gelfiltration an Sephadex G-75 ($150 \times 2 \text{ cm}$)
Die Säule war mit $0,1 \text{ M NH}_4\text{HCO}_3$ (pH 9) äqui-
libriert und wurde mit ca. 12 ml/h betrieben,
Fraktionen von $4,2 \text{ ml}$ wurden gesammelt,

Im Verlauf der Sequenzanalyse wurde das Proteinmaterial der beiden kleinen Peaks C und D der Abb.1 als zwei Bruchstücke der B-Kette identifiziert, die je nach Präparat in einem Ausmaß von 5% bis 25% auftraten. Das gleiche Material fand sich, in aminoäthylierter Form nicht aufgetrennt, in Peak C der Abb. 2.

Tab.3 Aminosäurezusammensetzung der Ketten des Kallikreins
(Reste pro Molekül) (28)

Amino- säuren	A-Kette	B-Kette	Kallikrein
Asp	10	18	28
Thr	3	12	15
Ser	4	10	14
Glu	8	15	23
Pro	4	12	16
Gly	7	15	22
Ala	5	8	13
Cys/2	3	7	10
Val	6	4	10
Met	0	4	4
Ile	3	9	12
Leu	5	15	20
Tyr	3	4	7
Phe	6	4	10
Lys	3	7	10
His	5	3	8
Arg	2	1	3
Trp	4	3	7
Summe	80	152	232

Bei der Gelfiltration reduzierten und aminoäthylierten ebenso wie carboxymethylierten Kallikreins an Sephadex G-75 in 50 %iger Essigsäure ließen sich die Kallikreinbruchstücke entsprechend ihrer tatsächlichen Größe eluieren (Abb.3). Im ersten Gipfel fand sich reine B-Kette; zwar enthielt dementsprechend der zweite Gipfel die A-Kette, jedoch in einer Mischung mit den beiden B-Ketten Bruchstücken C und D, die eine der A-Kette vergleichbare Molekülgröße aufweisen.

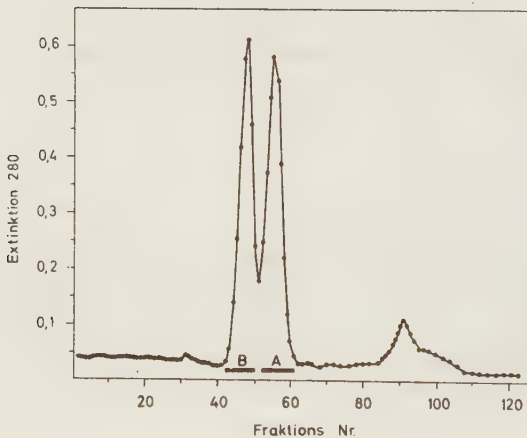


Abb.3 Gelfiltration reduzierten und aminoäthylierten Kallikreins (13,3 mg) an Sephadex G-150 (150 x 2 cm) in 50% Essigsäure
Die Säule wurde mit ca. 10 ml/h eluiert und Fraktionen mit 3,0 ml gesammelt.

A-Kettensequenz

Obwohl, vielleicht wegen ihrer Aggregationsneigung, eine Reinigung der A-Kette durch Ionenaustauschchromatographie nicht gelang, war das Material allein durch die Gelfiltration in leicht alkalischer Lösung (Abb.2) in genügender Reinheit zu erhalten, um die Sequenzanalyse von 40 aminoterminalen Resten durch den Sequenatorabbau unmittelbar zu ermöglichen. Die Aufklärung der gesamten Sequenz der 80 Aminosäurereste umfassenden A-Kette ließ sich durch automatischen Edmanabbau der tryptischen Peptide in ihrer carboxymethylierten Form erreichen (s. Schema 3, Reste 16 bis 95B).

II. Aufgabenstellung

Die entsprechend der Abb.1 isolierte carboxymethylierte B-Kette war rein genug, um beim Sequenatorabbau die Aminosäuresequenz von 33 N-terminalen Resten zu liefern.

Die Kombination von Bromcyanspaltung mit der tryptischen Spaltung dabei erhaltener Peptide sowie der Sequenatorabbau des Bruchstückes D ermöglichte die Aufklärung der Aminosäuresequenz von Lys 82 bis zum C-terminalen Prolin 152 der B-Kette (s. Schema 1).

Im weiteren zu erläuternde schwierige Gegebenheiten machten jedoch die 48 Aminosäurereste zwischen Gln 33 und Lys 82 dieser Kette zu einem besonders problematischen Teilstück. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Untersuchungen zur Struktur dieses letzten ungeklärten Segments in der Aminosäuresequenz des Kallikreins B aus Schweinepankreas.

III. Bisherige Aufklärung der B-Kettensequenz

1. Bromcyanspaltung

Die Sequenzierung der Aminosäurereste 34 bis 81 der B-Kette kann nicht losgelöst von der Methodik und Problematik der früheren Untersuchungen betrachtet werden, so daß darauf, soweit zum Verständnis der gegenwärtigen Arbeit erforderlich, kurz eingegangen werden muß.

Die tryptische Spaltung aminoäthylierten maleylierten Materials erfolgte erwartungsgemäß an dem einzigen Argininrest der B-Kette. Für eine günstige Fraktionierung in zwei Bruchstücke erwies sich dieser Angriffspunkt jedoch nicht als geeignet, da mit dieser Methode nur ein N-terminales 14-Reste Peptid B(AE, mal)-T-II, s. Schema 2) abgespalten werden konnte.

Geeigneter Angriffspunkte stellen die 4 Methioninreste der B-Kette dar, die diese dem Angriff durch Bromcyan zugänglich machten. Die Auftrennung des Bromcyanspaltgemisches erfolgte durch Gelfiltration des lyophilisierten Materials an Sephadex G-75 in 50%iger Essigsäure (Abb.4).

In nicht ganz reiner Form konnten dabei in den ersten zwei Fraktionen die beiden größeren Peptide B-CB-I und B-CB-II mit 76 bzw. 39 Aminosäureresten erhalten werden.

Die Auftrennung des Gipfels IV (Abb.4) in die restlichen drei Peptide, die bei dieser Spaltung zu erwarten waren, gelang durch Ionenaustauschchromatographie an QAE-Sephadex unter verschiedenen Bedingungen. Dabei ließen sich ein 11-Reste-Peptid (B-CB-IV-1), ein 12-Reste-Peptid (B-CB-IV-2) und ein 14-Reste-Peptid (B-CB-IV-3) erhalten. Die Aminosäurezusammensetzung der 5 Bromcyanpeptide ist in Tab.4 zusammengestellt. Das Material des Gipfels III der Abb.4 erwies sich als ein 26-Reste-Peptid, das durch unvollständige Spaltung zwischen B-CB-IV-2 und B-CB-IV-3 zustandegekommen war.

Die Reinigung der beiden größeren Bromcyanpeptide B-CB-I und B-CB-II gestaltete sich äußerst schwierig. Nachdem eine Reihe von untersuchten Systemen der Ionenaustauschchromatographie keine befriedigenden Resultate geliefert hatte, wurde zu diesem Zweck die Chromatographie an SP-Sephadex in schwach gepufferter 50%iger Essigsäure mit einem Salzgradienten entwickelt (Abb.5).

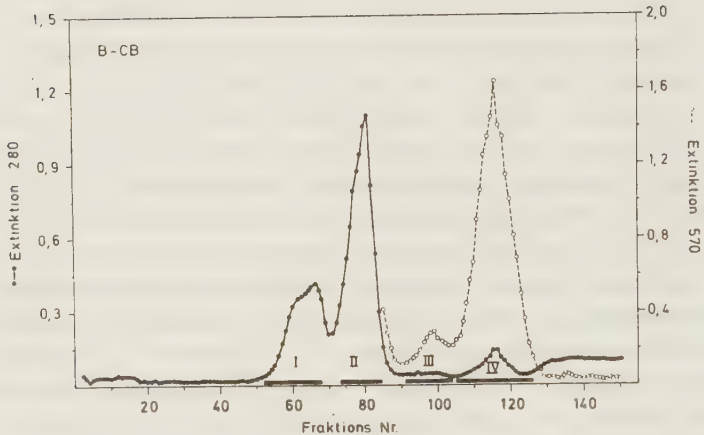


Abb.4 Auftrennung eines Bromcyanspaltansatzes von 2,71 μ Mol carboxymethylierter B-Kette durch Gelfiltration über Sephadex G-75 in 50%iger Essigsäure

Die Säule (170 x 2 cm) wurde mit ca. 18 ml/h betrieben und Fraktionen von 3,7 ml gesammelt. Für die Ninhydrindetektion wurden Proben von 0,1 ml pro Fraktion eingesetzt. Das Ausschlußvolumen der Säule lag bei Fraktion 48, niedermolekulares Material wurde bei Fraktion 150 eluiert.

Die Reihenfolge der fünf Bromcyanpeptide innerhalb der Aminosäuresequenz der B-Kette ließ sich wie folgt festlegen (s. Schema 1): Der Sequenatorabbau 33 N-terminaler Reste hatte in der Pos.11 einen Methioninrest gezeigt, sodaß bei der Bromcyan-spaltung ein 11-Reste-Peptid entsprechender Aminosäurezusammensetzung entstanden sein mußte, bei dem es sich nur um B-CB-IV-1 handeln konnte.

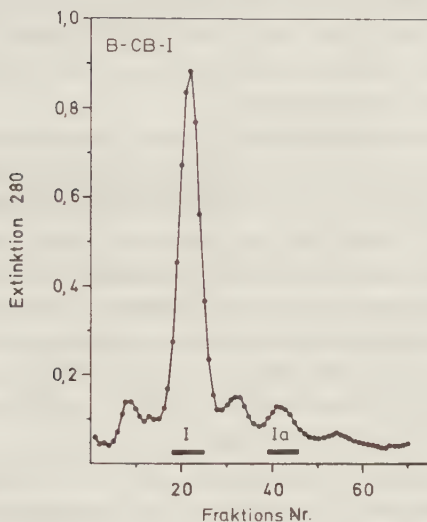


Abb.5 Rechromatographie von 2,09 μ Mol Peptid B-CB-I an SP-Sephadex C-25 (35 x 0,8 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0 bis 0,3 M NaCl in HAc 50%, 0,1 M NaOH

Das Volumen des gesamten Gradienten betrug 200 ml, die Elutionsgeschwindigkeit etwa 11 ml/h und die Fraktionsgröße 1,43 ml.

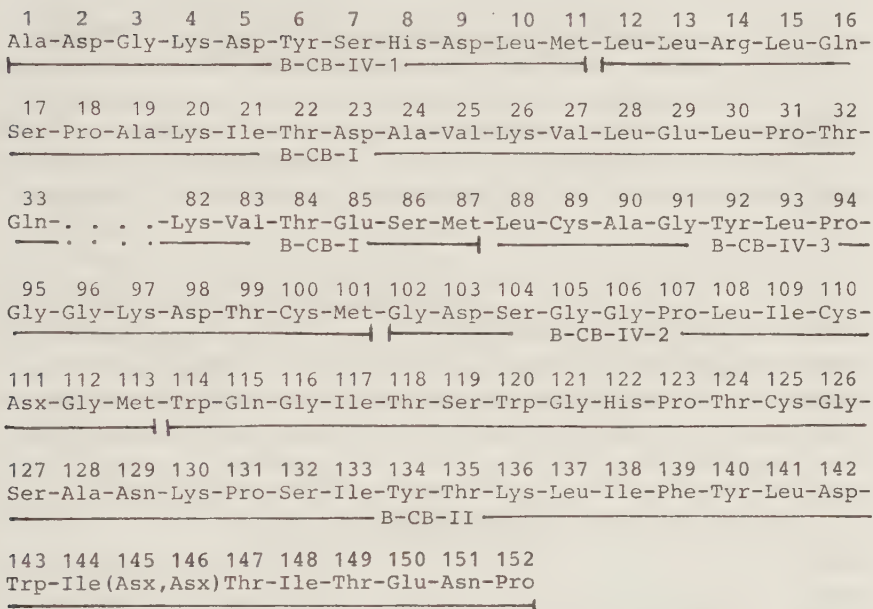
Da der automatische Edmanabbau den einzigen Argininrest der B-Kette der Pos.14 zugewiesen hatte und das 76-Reste-Peptid B-CB-I ebenfalls einen Argininrest aufwies, mußte B-CB-I unmittelbar an B-CB-IV-1 anschließen.

Bei der Spaltung einer Peptidkette an einer Met-X-Bindung durch Bromcyan entsteht aus dem angegriffenen Methionin die Aminosäure Homoserin (bzw. in pH-abhängigem Gleichgewicht damit Homoserinlacton), sodaß nur ein einziges, nämlich das carboxylendständige Bromcyanpeptid von Homoserin bzw. Homoserinlacton frei sein kann. Das Fehlen von Homoserin bzw. Homoserinlacton wies das 39-Reste-Peptid B-CB-II als dieses carboxylendständige Peptid aus. Die Auffindung der als C-Terminus der B-Kette identifizierten Aminosäure Prolin als Carboxylendgruppe von B-CB-II bestätigte diese Zuordnung.

Der automatische Edmanabbau ermöglichte die Bestimmung der Aminosäuresequenz der 28 N-terminalen Reste von B-CB-II. Die Sequenzierung eines damit überlappenden tryptischen Fragments (B-CB-II-T-1) vervollständigte die Aufklärung der Aminosäuresequenz der 39 C-terminalen Reste der B-Kette des Kallikreins. In diesem zuletzt erwähnten C-terminalen tryptischen 16-Reste-Peptid wurde der gesamte Gehalt der B-Kette an Glucosamin und somit wohl an Kohlehydrat überhaupt gefunden. Eine für die Anheftung von Glucosamin charakteristische Sequenz ließ Asn 148 als einzige Kohlehydratbindungsstelle der B-Kette wahrscheinlich werden.

Die beiden restlichen Bromcyanpeptide B-CB-IV-2 und B-CB-IV-3 mußten demzufolge unmittelbar benachbart, wie ja auch schon das Auftreten von B-CB-III bewiesen hatte, zwischen B-CB-I und B-CB-II angeordnet sein. Die Reihenfolge dieser beiden Peptide ließ sich durch den Vergleich ihrer Aminosäuresequenzen mit derjenigen des B-Ketten-Bruchstückes D (Abb.1) klären. Dabei zeigte sich, daß die Sequenz der Reste Leu 6 bis Met 19 des Frag-

Schema 1: In früheren Untersuchungen ermittelte Teilsequenz der B-Kette (28)



ments D vollständig mit der Aminosäuresequenz des 14-Reste-Peptids B-CB-IV-3 übereinstimmte. Da zudem die fünf aminoterminalen Reste des Fragments D einige Aminosäuren beinhalten, die das 12-Reste-Peptid B-CB-IV-2 nicht aufwies, mußte dieses letztere C-terminal von B-CB-IV-3 zwischen diesem und B-CB-II einzuordnen sein. Die Reihenfolge der Bromcyanpeptide ist graphisch in Schema 1 dargestellt.

Tab.4 Übersicht über die Zusammensetzung der Bromcyanpeptide der B-Kette

Positionen	1-152 B-Kette	1-11 B-CB- IV-1	12-87 B-CB-I	88-101 B-CB- IV-3	102-113 B-CB- IV-2	114-152 B-CB-II
Amino- säuren						
Asp	18	3	7	1	2	5
Thr	12		6	1		5
Ser	10	1	5		1	3
Glu	15		13			2
Pro	12		7	1	1	3
Gly	15	1	4	3	4	3
Ala	8	1	5	1		1
Cys/2	7		3	2	1	1
Val	4		4			
Met	4	1	1	1	1	
Ile	9		3		1	5
Leu	15	1	9	2	1	2
Tyr	4	1		1		2
Phe	4		3			1
Lys	7	1	3	1		2
His	3	1	1			1
Arg	1		1			
Trp	4		1			3
Summe	152	11	76	14	12	39

2. Tryptische Spaltung von B-CB-I

Carboxymethyliertes Peptid

Die Verteilung der durch Trypsin angreifbaren 3 Lysinreste und des einen Argininrestes in B-CB-I erwies sich zur Gewinnung sequenatorgeeigneter Peptide als recht ungünstig. Wie schon die bisher ermittelte Aminosäuresequenz zeigte (s. Schema 1), mußte der Argininrest in der dritten und je ein Lysinrest in der 9., der 15. und der 71. Position des 76-Reste-Peptids zu finden sein, so daß bei vollständiger tryptischer Spaltung ein Tripeptid, zwei Hexapeptide, ein großes 56-Reste-Peptid und ein C-terminales 5-Reste-Peptid entstehen sollten. Es war somit zu erwarten, daß mit dem 56-Reste-Peptid noch immer ein für den Sequenatorabbau zu großes Bruchstück verbleiben würde.

Die Durchführung dieser tryptischen Spaltung lieferte neben dem erwarteten Tripeptid (B-CB-I-T-II-3) und den beiden Hexapeptiden (B-CB-I-T-II-1 und B-CB-I-T-II-2) allerdings sogar ein C-terminales 61-Reste-Peptid (B-CB-I-T-I), das sich auch bei intensiver Weiterspaltung mit Trypsin als an Lys 82 nur schlecht angreifbar erwies.

Aminoäthyliertes Peptid

Da Trypsin außer Lysyl- und Arginyl- auch die Aminoäthylcysteinyl-peptidbindung anzugreifen in der Lage ist, sollte für die weitere Fragmentierung der Gehalt von B-CB-I an drei Aminoäthylcysteinresten genutzt werden. Abb.6 zeigt die Auftrennung eines tryptischen Spaltgemisches von aminoäthyliertem B-CB-I durch Gelfiltration.

Da die bereits bei der Isolierung der tryptischen Fragmente aus carboxymethyliertem B-CB-I erhaltenen beiden Hexapeptide B-CB-I-T-II-1 und B-CB-I-T-II-2 sowie das Tripeptid B-CB-I-T-II-3 cysteinfrei waren, sollten diese Bruchstücke auch bei der tryptischen Spaltung aminoäthylierten B-CB-I in unveränderter Form

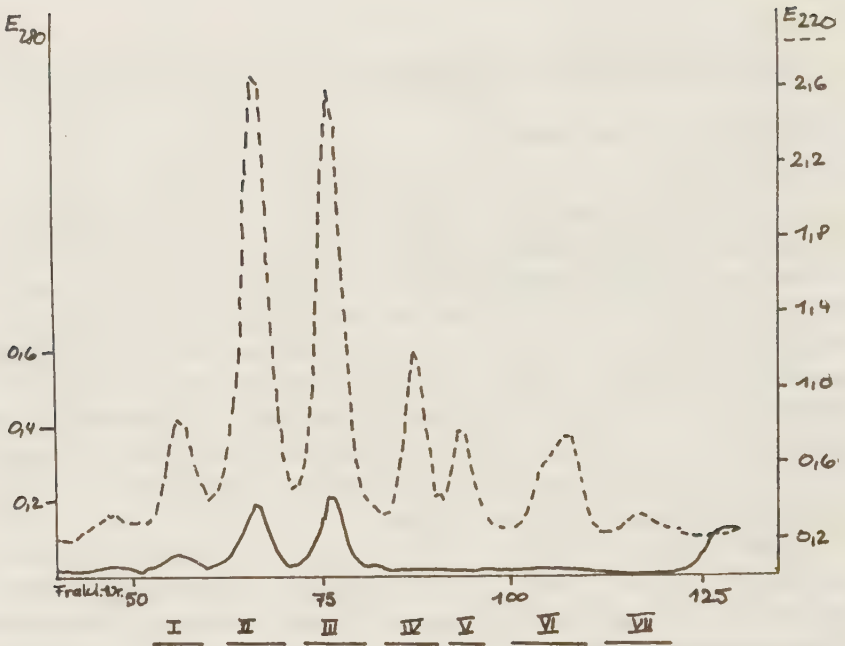


Abb.6 Gelfiltration des tryptischen Spaltansatzes von $0,7 \mu\text{Mol}$ B-CB-I (AE) an Sephadex G-50 fine (140 x 1,5 cm) in $0,1 \text{ M NH}_4\text{HCO}_3$ pH 8,5

Die Elutionsgeschwindigkeit betrug ca. 10 ml/h und die Fraktionsgröße 1,65 ml.

isolierbar sein. Die beiden Hexapeptide fanden sich in der Fraktion 6 und das Tripeptid in der Fraktion 7 der Abb.6.

Die Fraktion B-CB-I(AE)-T-2 erwies sich als Peptid mit 46, B-CB-I(AE)-T-3 als Peptid mit 34 Aminosäureresten. Die Fraktionen B-CB-I(AE)-T-4 und B-CB-I(AE)-T-5 enthielten Peptide mit 15 bzw. 12 Aminosäureresten. Tab.5 gibt die Aminosäurezusammensetzung der

Tab.5 Übersicht über die tryptischen Peptide von B-CB-I(AE)
(vgl. Schema 2)

Positionen	12-87 B-CB-I	12-14 B-CB- I-T- II-3	15-20 B-CB- I-T- II-2	21-26 B-CB- I-T- II-1	27-41 B-CB- I-T-4 (AE)	42-75 B-CB- I-T-3 (AE)	76-87 B-CB- I-T-5 (AE)	42-87 B-CB- I-T-2 (AE)
Amino- säuren								
Asp	7			1		4	2	6
Thr	6			1	2	2	1	3
Ser	5		1		1	2	1	3
Glu	13		1		4	7	1	8
Pro	7		1		2	3	1	4
Gly	4				1	3		3
Ala	5		1	1		1	2	3
AetCys	3				1	2		2
Val	4			1	1	1	1	2
Met	1						1	1
Ile	3			1		2		2
Leu	9	2	1		3	3		3
Tyr								
Phe	3					3		3
Lys	3		1	1			1	1
His	1						1	1
Arg	1	1						
Trp	1					1		1
Summe	76	3	6	6	15	34	12	46

nach der tryptischen Spaltung von aminoäthyliertem B-CB-I(AE) erhaltenen Peptide wieder.

Die Einordnung dieser Fragmente in die Sequenz des zugrundeliegenden Bromcyanpeptids ließ sich wie folgt treffen (vgl. Schema 2): Das N-terminale Tripeptid und die darauffolgenden beiden Hexapeptide waren bereits durch den Vergleich ihrer Aminosäurezusammensetzung mit der N-terminalen Sequenz der B-Kette festzulegen.

Die Summe der Aminosäurereste des 46-Reste-Peptids B-CB-I(AE)-T-2 und des 15-Reste-Peptids B-CB-I(AE)-T-4 deckte sich mit dem Gehalt von B-CB-I-T-I an 61 Resten. Zudem verwies der Homoseringehalt des 46-Reste-Peptids auf seine C-terminale Stellung. Da das 46-Reste-Peptid noch zwei Aminoäthylcysteinreste enthält, konnte nur der tryptische Angriff an einem Aminoäthylcysteinrest, der sich in Pos.41 befinden mußte, zum Auftreten des 15-Reste und des 46-Reste-Peptids geführt haben.

Zusätzlich mußte in einem Ausmaß von ca. 50% innerhalb des 46-Reste-Peptids an einem Aminoäthylcysteinrest in der Pos.75 eine weitere Spaltung in das 34-Reste-Peptid B-CB-I(AE)-T-3 und das 12-Reste-Peptid B-CB-I(AE)-T-5 aufgetreten sein. Dabei wies der Homoseringehalt des 12-Reste-Peptids dieses als C-terminal aus.

3. Problematik

Die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen ließen vermuten, daß die eben kurz umrissene tryptische Spaltung des aminoäthylierten 76-Reste-Bromcyanpeptids einen gangbaren Weg zur Ermittlung der vollständigen Aminosäuresequenz der B-Kette darstellen würde.

Jedoch ergab sich zu diesem Zeitpunkt eine Problematik, die entgegen den ursprünglichen Erwartungen diesen Weg erschwerte. Bis hin zur Isolierung des Peptids B-CB-I durch die Gelfiltra-

tion im Anschluß an die Bromcyanspaltung der B-Kette zeigten aminoäthylisiertes und carboxymethyliertes Material zunächst gleiches Verhalten. Die Elutionsdiagramme bei der Auftrennung des Bromcyanspaltgemisches sowohl carboxymethylierter als auch aminoäthylierter B-Kette war völlig identisch (vgl. Abb.4 u.16).

Die im Anschluß daran erforderliche weitere Reinigung des inhomogenen Peptides B-CB-I durch Ionenaustauschchromatographie an SP-Sephadex in schwach gepufferter 50%iger Essigsäure lieferte jedoch bei aminoäthyliertem Material ein völlig anderes Bild (Abb.7), als sich bei carboxymethyliertem B-CB-I ergeben hatte (Abb.5).

Homogenes aminoäthylisiertes Bromcyanpeptid B-CB-I(AE) konnte dabei nur aus dem ersten Gipfel und dabei nur in einer Ausbeute von ca. 10 bis 15% der eingesetzten Menge isoliert werden. Mehrere Präparationen lieferten unter gleichen Bedingungen ein reproduzierbares Ergebnis.

Der anschließende Versuch, die aminoäthylierte B-Kette bereits vor der Bromcyanspaltung durch Chromatographie unter den gleichen Bedingungen, wie sie in Abb.7 angegeben sind, homogen zu erhalten, führte statt zu einem scharfen Peak, wie er bei der Rechromatographie carboxymethylierter Kette an DEAE-Sephadex erhalten worden war, zu einem breiten verwaschenen Gipfel, der sich über mehr als 50 Fraktionen hinstreckte.

Da bei der Carboxymethylierung Mercaptoäthanol und Jodessigsäure in äquimolarem Verhältnis zur Anwendung gekommen waren, lag die Vermutung nahe, daß der in den bisher erwähnten Präparationen von aminoäthyliertem Kallikrein verwendete 8,3fache Überschuß von Äthylenimin über das Reduktionsmittel Anlaß für die chromatographische Heterogenität des so erhaltenen Materials sein könnte. Deshalb wurde zunächst eine Reihe von Versuchen in Angriff genommen, die eine Erhöhung der Ausbeuten an chromatographisch reinem aminoäthyliertem Bromcyanpeptid B-CB-I(AE) zum Ziele hatten.

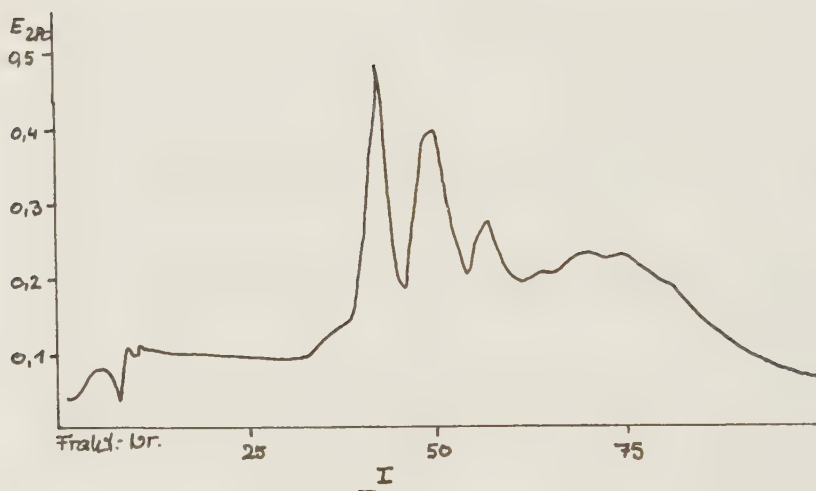


Abb.7 Rechromatographie des aminoäthylierten Bromcyanpeptids B-CB-I an SP-Sephadex C-25 (35 x 0,8 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0 bis 0,5 M NaCl in HAc 50%, 0,05 M NaOH

Das Volumen des gesamten Gradienten betrug 300 ml, die Elutionsgeschwindigkeit ca. 11 ml/h und die Fraktionsgröße 2,16 ml.

IV. Neuere Ergebnisse

1. Aminoäthylierung

Reproduzierbarkeit

Während sich Kallikrein nach Reduktion und Carboxymethylierung stets reproduzierbar mittels Gelfiltration in schwach alkalischer Lösung (vgl. Abb.1) auftrennen ließ, bereitete die Isolierung der Ketten des Kallikreins nach der Aminoäthylierung unter sonst gleichen Bedingungen teilweise erhebliche Probleme. So bildeten sich bei einigen Präparationen aus nicht zu klärender Ursache bei der Gelfiltration unter den in Abb.2 angegebenen Bedingungen Niederschläge, die jeweils zu einem teilweisen Verlust des wertvollen Ausgangsmaterials führten. Auch die Veränderung des pH-Wertes von 9 auf 7 änderte nichts an diesem Verhalten.

Um wenigstens einen Teil des ausgefallenen Proteinmaterials zurückzugewinnen, wurde das von der Säule auf eine Nutsche überführte Sephadexgel mehrfach mit 50%iger Essigsäure gewaschen und anschließend das Volumen des Eluates am Rotationsverdampfer eingengt. Dabei ergab sich eine zähe gelbliche Lösung.

Obwohl bei der Gelfiltration dieses Produktes an Sephadex G-75 in 50%iger Essigsäure ein der Abb.3 entsprechendes Elutionsdiagramm erhalten werden konnte, lieferte die Auftrennung des Bromcyanspaltgemisches der so isolierten B-Kette entsprechend den in Abb.4 angegebenen Bedingungen ein von dem dortigen Ergebnis völlig verschiedenes Resultat. Ein Gipfel, der seiner Elutionsposition zufolge am ehesten mit dem benötigten Peptid B-CB-I(AE) zu identifizieren war, wurde unter den in Abb.7 angegebenen Bedin-

gungen der Ionenaustauschchromatographie unterzogen. Zwar wies das dabei erhaltene Elutionsdiagramm qualitativ noch Ähnlichkeit mit demjenigen der Abb.7 auf, jedoch traten die einzelnen Gipfel zugunsten des offensichtlich sehr viel heterogeneren Untergrundes stark zurück.

Die schlechte Reproduzierbarkeit der Auftrennung aminoäthylierter Kallikreinketten in schwach alkalischem bis neutralem Milieu veranlaßte uns, nachdem auch 0,2 N Essigsäure als Elutionsmittel unbefriedigende Ergebnisse erbracht hatte, die Kettentrennung durch Gelfiltration in 50%iger Essigsäure wieder aufzunehmen. Bei dieser Form der Isolierung waren bisher weder schlechte Reproduzierbarkeit noch Aggregationsphänomene zu beobachten gewesen.

Zu diesem Zweck wurden 123 mg Kallikrein (NKE-B-KZC 123/7) unter den gleichen Bedingungen wie bislang (s. Methoden) reduziert und aminoäthyliert. 10 min nach Zugabe der letzten Portion Äthylenimin wurde das Reaktionsgemisch schnell mit dem gleichen Volumen an 96%iger Essigsäure vermischt, um einen langsamen Übergang vom pH-Wert 8,6 der Pufferlösung in das stark saure Elutionsmedium zu vermeiden. Entsprechend unseren Erfahrungen mit 0,2 N Essigsäure wären dabei ebenfalls Niederschläge zu befürchten gewesen. Nach Zugabe der Säure erwärmte sich die Lösung und verfärbte sich gelblich. Die anschließende Gelfiltration an Sephadex G-75 in 50%iger Essigsäure ergab ein Elutionsdiagramm, das jenem der Abb.3 entsprach.

Da sich bei dieser Form der Präparation wie oben beschrieben zwar reine B-Kette erhalten ließ, die A-Kette jedoch gemeinsam mit den beiden B-Kettenbruchstücken eluiert wurde, war in früheren Versuchen diese Methodik der Kettentrennung nicht weiter verfolgt worden. Nachdem mit dem Abschluß der Sequenzierungsarbeiten an der A-Kette jedoch deren Isolierung in reiner Form überflüssig geworden war, schien sich damit eine geeignete Isolierungsmethode für aminoäthylierte B-Kette anzubieten.

Die Auftrennung des Bromcyanspaltgemisches der dergestalt isolierten B-Kette durch Gelfiltration ergab jedoch ebenfalls wieder ein sehr unübersichtliches Bild. Wie hieraus bereits zu vermuten, lieferte die Rechromatographie von Material, das auf Grund seiner Elutionsposition als B-CB-I(AE) betrachtet werden konnte, unter den in Abb.7 angegebenen Bedingungen ein Elutionsdiagramm, das nur durch sehr starke ladungsmäßige Heterogenität des Peptidmaterials erklärbar war (Abb.8).

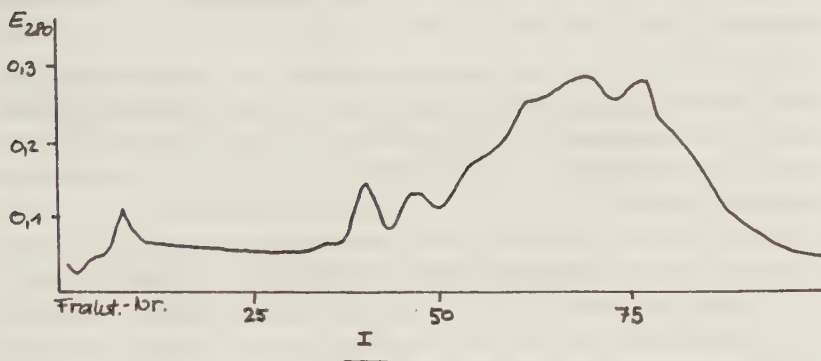


Abb.8 Rechromatographie von vermutlichem B-CB-I(AE) an SP-Sephadex C-25 (35 x 0,8 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0 bis 0,5 M NaCl in HAC 50%, 0,05 M NaOH

Gradientenvolumen 300 ml, Elutionsgeschwindigkeit 10,5 ml/h, Fraktionsgröße 2,1 ml,

Da die Erwärmung, Gelbfärbung und die starke Heterogenität des isolierten Materials nach dem Ansäuern des Reaktionsgemisches von Reduktion und Aminoäthylierung an eine Polymerisationsreaktion des im Überschuß eingesetzten Äthylenimins denken ließ, wurde im nächsten Versuch der Gelfiltration in 50%iger Essigsäure die Dialyse gegen 0,1 M NH_4HCO_3 -Lösung zur Entfernung überschüssiger Reagentien vorgeschaltet.

Für diese Reduktion und Aminoäthylierung wurden 95 mg NKE-B-KZC 123/7 unter den gleichen Bedingungen wie eben beschrieben umgesetzt und das nach der Dialyse lyophilisierte Produkt durch Gelfiltration an Sephadex G-75 in 50%iger Essigsäure in die beiden erwarteten Fraktionen aufgetrennt (Elutionsdiagramm analog Abb.3).

Um die chromatographische Einheitlichkeit der so isolierten B-Kette zu überprüfen, sollte damit eine Ionenaustauschchromatographie an QAE-Sephadex in 0,05 M TEAA-Lösung bei pH 6,0 durchgeführt werden. Das Material erwies sich jedoch unter diesen Bedingungen als unlöslich.

Eine statt dessen durchgeführte Chromatographie von 10% dieses Materials an SP-Sephadex in 50%iger Essigsäure, gepuffert mit 0,05 M NaOH und einem linearen Konzentrationsgradienten bis 0,75 M NaCl erbrachte die Elution aminoäthylierter B-Kette in einem ca. 50 Fraktionen breiten Gipfel (Abb.9).

Die verbliebene Hauptmenge (ca. 90%) der aminoäthylierten B-Kette wurde der Bromcyanspaltung unterworfen, und das gefriergetrocknete Spaltgemisch durch Gelfiltration an Sephadex G-75 aufgetrennt (Abb.10). Die Rechromatographie des so erhaltenen Peptids B-CB-I(AE) an SP-Sephadex in gepufferter 50%iger Essigsäure führte zu einem Ergebnis, wie es bereits früher ähnlich erhalten worden war (Abb.7).

Durch Dialyse und anschließende Gelfiltration des gefriergetrockneten Aminoäthylierungsgemisches konnte also die schlechte Reproduzierbarkeit der Trennung aminoäthylierter Ketten beseitigt werden.

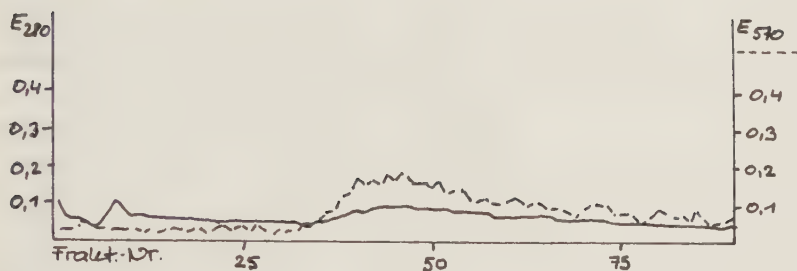


Abb.9 Chromatographie nach alten Bedingungen
aminoäthylierter B-Kette an SP-Sephadex
C-25 (35 x 0,8 cm) mit einem linearen
Konzentrationsgradienten von 0 bis 0,75
M NaCl in HAc 50%, 0,05 M NaOH

Gradientenvolumen 300 ml, Fraktionsgröße
2,1 ml, Probenahme pro Fraktion für Nin-
hydrindetektion: 0,1 ml,

Ihre starke chromatographische Heterogenität machte jedoch weite-
re Untersuchungen zur Gewinnung einheitlicheren Materials erfor-
derlich.

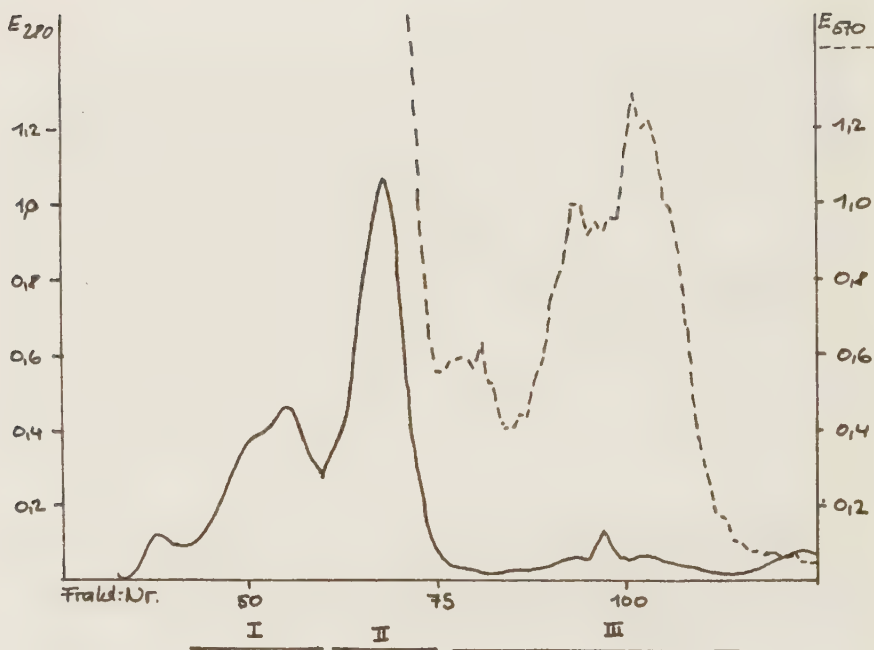


Abb.10 Auftrennung des Bromcyanspaltgemisches nach alten Bedingungen aminoäthylierter B-Kette durch Gelfiltration an Sephadex G-75 (180 x 2 cm) in 50% Essigsäure

Tropfgeschwindigkeit ca. 20 ml/h, Fraktionsgröße ca. 4,5 ml, Probenahme für Ninhydrindetektion: 0,1 ml/Fr,

Homogenität

In einigen weiteren Ansätzen wurde deshalb versucht, die Bedingungen von Reduktion und Aminoäthylierung des Kallikreins mit dem Ziel einer möglichst weitgehenden Beseitigung der chromatographischen Uneinheitlichkeit zu variieren.

Entsprechend der in (29) angegebenen Methode wurden zu diesem Zweck weitere 123 mg Kallikrein (NKE-B-KZC 123/7), gelöst in 10 ml Puffer (6 N GuHCl, 0,66 M Tris/HCl pH 8,6, 0,01% EDTA) mit 100 μ l Mercaptoäthanol (1,42 mMol) 20 h unter N₂ bei Raumtemperatur inkubiert. Die Aminoäthylierung erfolgte anschließend unter N₂-Schutz durch Zugabe von 90 μ l Äthylenimin (1,74 mMol) in drei Portionen. Puffer und überschüssige Reagentien wurden durch Dialyse gegen mehrfach gewechselte 0,1 M NH₄HCO₃-Lösung bei pH 8,5 entfernt. Das Elutionsdiagramm der anschließenden Gelfiltration des so erhaltenen Reaktionsproduktes ist in Abb. 11 dargestellt. Statt der erwarteten zwei Gipfel ergaben sich dabei 3 Peaks, deren Elutionspositionen vermuten ließen, daß es sich beim Material des ersten Gipfels um un- oder nur teilweise gespaltenes Kallikrein, beim zweiten Gipfel um B- und beim dritten Gipfel um A-Kette handelte.

Der zweite Gipfel wurde wie angegeben vereinigt, am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht und durch eine weitere Gelfiltration diesmal an Sephadex G-75 in 0,1 M NH₄HCO₃-Lösung bei pH 8,5 in zwei weitere Peaks aufgetrennt (Abb.12). Das Material des dabei erhaltenen zweiten Peaks wurde der Ionenaustauschchromatographie an SP-Sephadex unter sauren Bedingungen unterzogen (Abb.13). Wie die Aminosäureanalyse dieses Materials zeigte (Tab.6), war es unter den angegebenen Bedingungen zum ersten Mal geglückt, aminoäthylierte B-Kette bei der Ionenaustauschchromatographie als scharfen Peak (vgl. dagegen Abb.9) und somit wohl in ladungsmäßig homogener Form zu erhalten. Bemerkenswerterweise enthielt die dergestalt isolierte B-Kette im Vergleich zu aminoäthylierter B-Kette in früheren Versuchen 6,0 statt 4,8 Aminoäthylcyste-

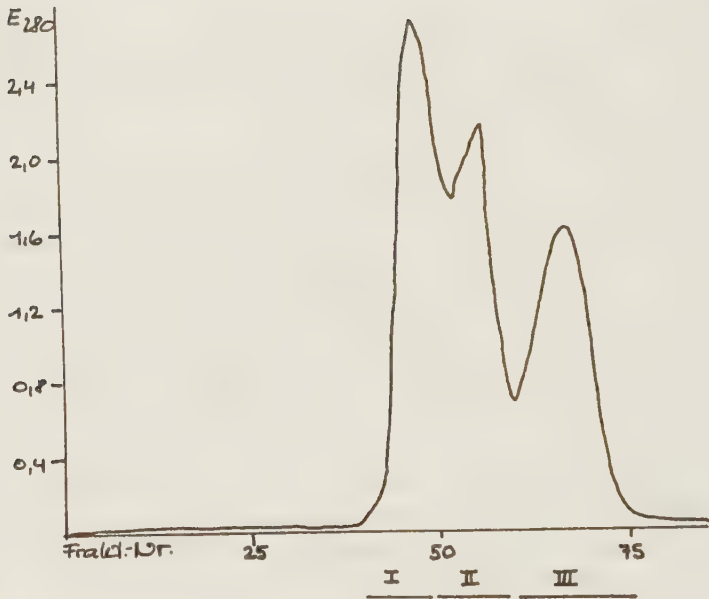


Abb.11 Auftrennung der Fragmente nach Reduktion und Aminoäthylierung (1,25facher Überschuß) von 123 mg Kallikrein durch Gelfiltration an Sephadex G-75 (180 x 2 cm) in 0,1 M NH_4HCO_3 -Lösung bei pH 8,5

Laufgeschwindigkeit ca. 12 ml/h, Fraktionsgröße 3,5 ml,

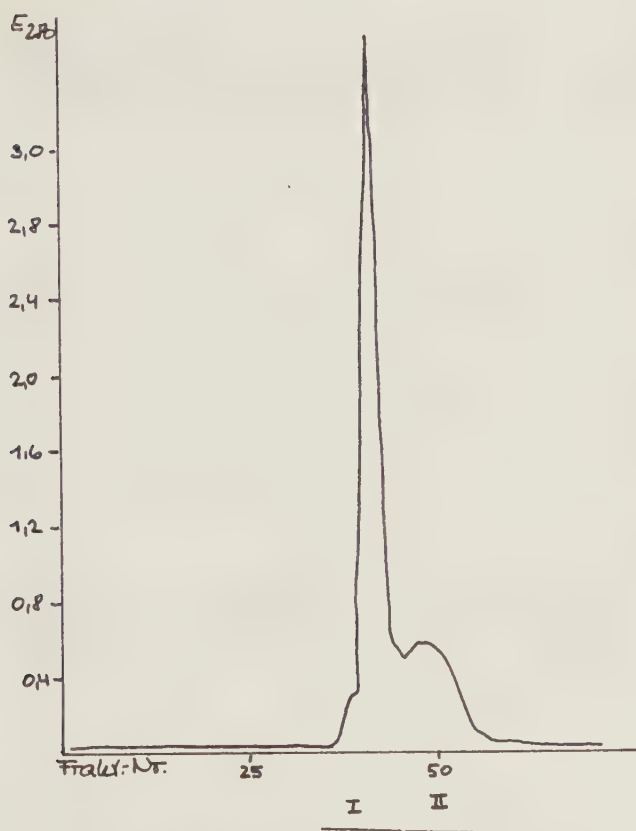


Abb.12 Nachtrennung des Gipfels II der Abb.11 durch Gelfiltration an Sephadex G-75 (180 x 2 cm) in 0,1 M NH_4HCO_3 -Lösung bei pH 8,5
Elutionsgeschwindigkeit ca. 12 ml/h,
Fraktionsgröße 3,9 ml,

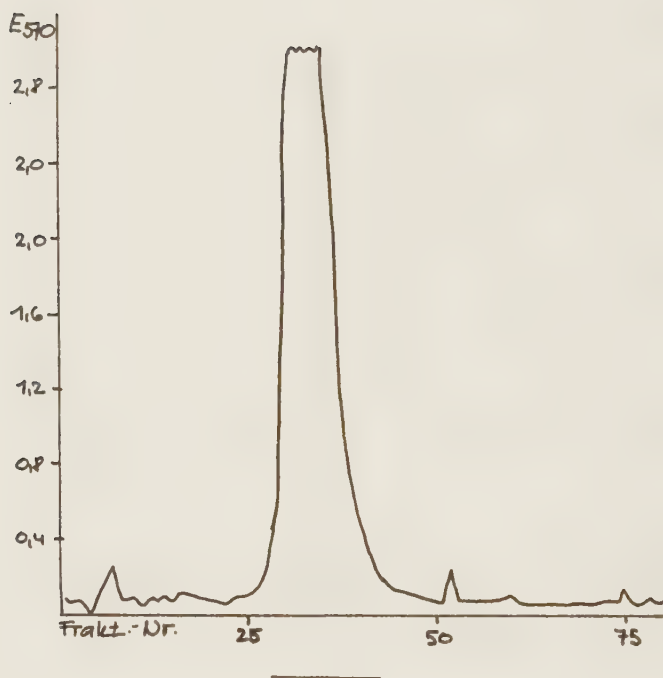


Abb.13 Chromatographie von B-Kette aus dem 2. Gipfel der Abb.12 an SP-Sephadex C-25 (35 x 0,8 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0 bis 1,25 M NaCl in HAc 50%/0,05 M NaOH

Gradientenvolumen 250 ml, Elutionsgeschwindigkeit 9 ml/h, Fraktionsgröße 1,5 ml, zur Ninhydrindetektion eingesetzt: 0,5 ml/Fraktion,

Tab.6 Aminosäurezusammensetzung aminoäthylierter B-Kette nach der Rechromatographie an SP-Sephadex (Abb.13, Reste pro Molekül)

Amino- säuren		zu erwarten
Asp	17,19	18
Thr	11,15	12
Ser	10,54	10
Glu	15,02	15
Pro	13,19	12
Gly	15,09	15
Ala	7,74	8
AetCys	6,00	7
Val	4,05	4
Met	3,35	4
Ile ¹⁾		9
Leu ¹⁾		15
Tyr	4,69	4
Phe	4,86	4
Lys ²⁾		7
His	3,21	3
Arg	0,98	1

1) Ile und Leu nicht abgetrennt von Glucosamin

2) Lys nicht abgetrennt von NH₃

inreste. Somit ließ sich durch Verwendung eines nur 1,25fachen Überschusses von Äthylenimin über Mercaptoäthanol zwar wohl homogene B-Kette isolieren, jedoch konnte die Ausbeute bei weitem nicht befriedigen, da aus der eingesetzten Menge von ca. 4 μMol Kallikrein nur ca. 0,6 μMol B-Kette gewonnen werden konnten.

Da nicht auszuschließen war, daß die Alterung der bislang verwendeten Äthylenimincharge zu den Problemen der Aminoäthylierung beigetragen hatte, wurde ein weiterer Versuch mit frischem Reagens einer anderen Herstellerfirma unter denselben Bedingungen wie eben beschrieben durchgeführt. Das Elutionsdiagramm der Auftrennung der Spaltprodukte bei der Gelfiltration deutete jedoch ebenfalls auf eine maximal 30%ige Ausbeute an reiner B-Kette hin, so daß sich durch Verwendung eines frischen Reagens kein Fortschritt erzielen ließ.

Nachdem weder ein hoher Überschuß an Äthylenimin (8,3fach) noch fast äquimolare Verhältnisse (1,25facher Überschuß) noch unterschiedliche Reagentien befriedigende Resultate geliefert hatten, sollten in weiteren Versuchen Reaktionsbedingungen zwischen diesen Extremen untersucht werden.

Dazu wurden 17,6 mg NKE-B-KZC 453, gelöst in 2,0 ml Puffer (6 N GuHCl , 0,66 M Tris/HCl pH 8,6, 0,01 % EDTA), unter N_2 mit 40 μl (0,57 mMol) Mercaptoäthanol 18 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in 3 Portionen insgesamt 90 μl (1,74 mMol) Äthylenimin, also ein dreifacher Überschuß, zugesetzt. Nach der Abtrennung niedermolekularer Bestandteile durch Gelfiltration über Sephadex G-25 fine in 0,1 M NH_4HCO_3 pH 8,5 wurde der lyophilisierte Spaltansatz durch Gelfiltration über Sephadex G-75 in 50%iger Essigsäure in zwei Fraktionen aufgetrennt (Abb.14). Ein Hinweis auf ungenügend reduziertes und aminoäthyliertes Kallikrein war nicht mehr zu erkennen. Die Aminosäureanalyse (Tab.7) wies das

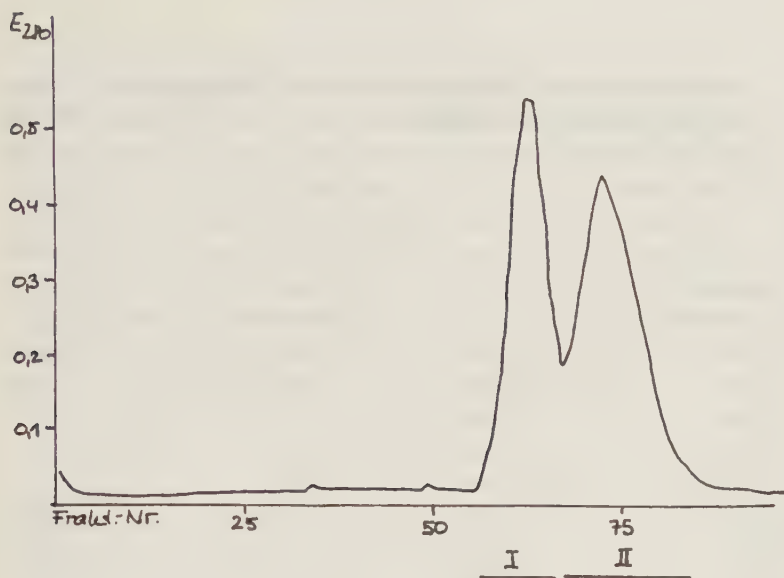


Abb.14 Auftrennung der Ketten nach Reduktion und Aminoäthylierung (3facher Überschuß) von 17,6 mg Kallikrein durch Gelfiltration an Sephadex G-75 (180 x 2 cm) in 50%iger Essigsäure

Elutionsgeschwindigkeit ca. 25 ml/h,
Fraktionsgröße ca. 3,0 ml,

Material des ersten Gipfels als reine B-Kette mit einem der carboxymethylierten Modifikation entsprechenden Gehalt von sieben Aminoäthylcysteinresten aus.

Die so erhaltene B-Kette wurde der Bromcyanspaltung unterworfen und gefriergetrocknet. Bei der anschließenden Gelfiltration ergab sich ein der Abb.4 analoges Bild. Zwar zeigte nach der da-

Tab.7 Aminosäurezusammensetzung isolierter B-Kette
(Abb.14, Reste pro Molekül)

Amino- säuren		zu erwarten
Asp	18,43	18
Thr	11,66	12
Ser	10,93	10
Glu	15,80	15
Pro	10,94	12
Gly	15,72	15
Ala	8,44	8
AetCys	6,94	7
Val	4,37	4
Met	3,56	4
Ile ¹⁾		9
Leu ¹⁾		15
Tyr	4,26	4
Phe	3,79	4
Lys	6,98	7
His	2,77	3
Arg	0,83	1

1) nicht von Glucosamin abgetrennt

raufhin durchgeführten Chromatographie des Peptids B-CB-I(AE) an SP-Sephadex das Elutionsdiagramm qualitativ eine ähnliche Auftrennung in drei Fraktionen, wie sie bereits in früheren Versuchen erhalten worden war (vgl. Abb.7), jedoch war deren Verhältnis untereinander stark zugunsten des erwünschten Produktes verschoben (Abb.15). 55% des eluierten Materials und damit doppelt so viel wie bislang fanden sich im ersten Gipfel. Die Aminosäurezusammensetzung des ersten und des zweiten Gipfels ist in Tab.8 wiedergegeben. Der Aminosäuregehalt des dritten Gipfels ließ keine Interpretation zu.

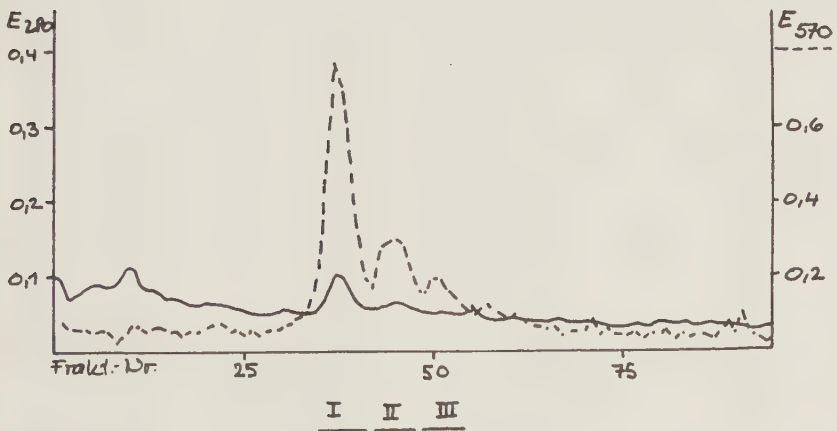


Abb.15 Chromatographie des aminoäthylierten 76-Reste-Bromcyanpeptids B-CB-I(AE) an SP-Sephadex C-25 (35 x 0,8 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0 bis 0,5 M NaCl in Hac 50%, 0,05 M NaOH

Gradientenvolumen 300 ml, Elutionsgeschwindigkeit 12 ml/h, Fraktionsgröße 2,4 ml, Probenahme für Ninhydrindetektion 0,2 ml/Fraktion

Tab.8 Aminosäurezusammensetzung des aminoäthylierten 76-Reste-Bromcyanpeptids B-CB-I(AE) nach der Chromatographie an SP-Sephadex (Abb.15)

Amino-säuren	Peak I	Peak II	zu erwarten
Asp	7,00	7,68	7
Thr	5,66	5,79	6
Ser	5,25	5,07	5
Glu/Hse	13,76	13,24	13 (1Hse/Hsl)
Pro	7,18	5,76	7
Gly	4,13	5,02	4
Ala	4,98	4,97	5
AetCys	2,91	2,79	3
Val	3,93	3,80	4
Met		0,16	0
Ile	2,96	3,16	3
Leu	8,50	9,18	9
Tyr	0,03	0,44	0
Phe	2,93	2,86	3
Lys	2,88	3,08	3
His	0,82	1,00	1
Arg	0,84	0,93	1

Da somit die Versuchsbedingungen ermittelt waren, die bei weitem die beste Ausbeute an reinem aminoäthyliertem Bromcyanpeptid erbrachten, wurde der Ansatz unter gleichen Bedingungen in größerem Maßstab mit 97,3 mg NKE-B-KZC 453 wiederholt. Dabei versuchten wir, die jeweils erhaltenen Mengen des gewünschten Materials auf den einzelnen Zwischenstufen quantitativ zu erfassen.

Nach Gefriertrocknung des entsalzten Spaltansatzes wurden entsprechend einer Doppelbestimmung durch quantitative Aminosäureanalyse 2,73 μMol Kallikrein zur Gelfiltration an Sephadex G-75 in 50%iger Essigsäure eingesetzt. Nach der Kettentrennung ergab die Aminosäureanalyse eine Ausbeute von 1,64 μMol (60%) an B- und 1,49 μMol an A-Kette. Berechnet nach dem Methioningehalt des zweiten Gipfels fanden sich dort ca. 0,45 μMol B-Kettenbruchstücke, entsprechend einer bei der Pankreasautolyse aufgetretenen Spaltung von ca. 20%.

Nach der Bromcyanspaltung der so isolierten B-Kette wurden 1,49 μMol (91%) des benötigten Peptids B-CB-I(AE) sowie 1,11 μMol des 39-Reste-Peptids B-CB-II erhalten (Abb.16). Die quantitative Doppelbestimmung der Peptidmenge im Hauptgipfel der Abb.17 erbrachte einen Gehalt von 0,59 μMol an chromatographisch einheitlichem 76-Reste-Peptid B-CB-I(AE), so daß die Gesamtausbeute in Bezug auf die eingesetzte B-Kette 42% betrug. Da die Aminosäurezusammensetzung eines unter identischen Chromatographiebedingungen isolierten Materials bereits in Tab.8 wiedergegeben wurde, ist zur Charakterisierung der bei der Bromcyanspaltung entstandenen Nebenprodukte in Tab.9 der Aminosäuregehalt der drei kleineren Gipfel a, b und c zusammengestellt.

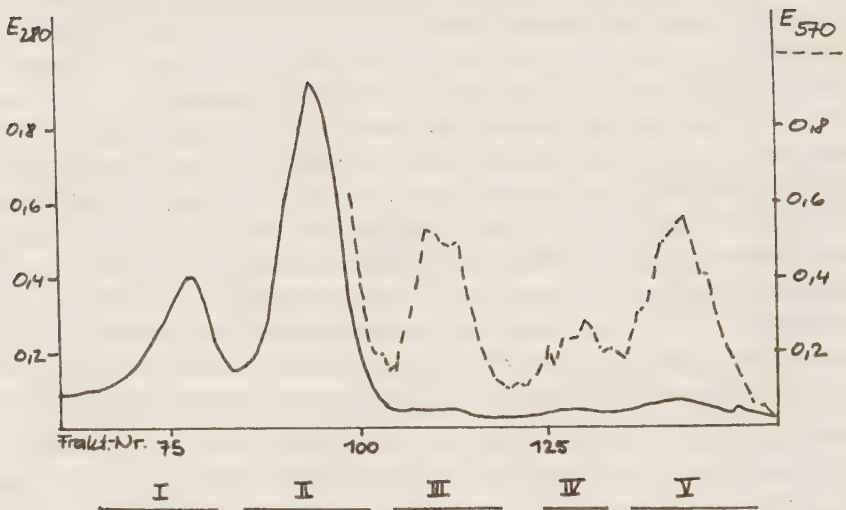


Abb.16 Auftrennung des Bromcyanspaltgemisches von 1,64 μ Mol B-Kette durch Gelfiltration an Sephadex G-75 (180 x 2 cm) in 50%iger Essigsäure

Elutionsgeschwindigkeit ca. 25 ml/h, Fraktionsgröße 3,0 ml, zur Ninhydrindetektion eingesetzt: 0,1 ml/Fraktion,

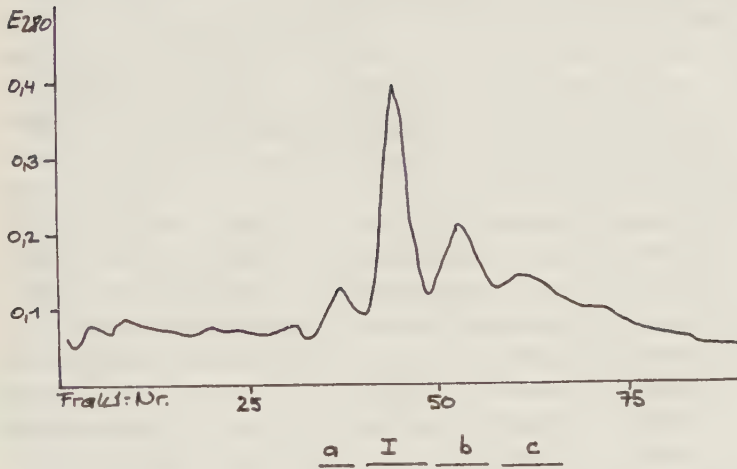


Abb.17 Chromatographie des 1.Gipfels der Abb.16 an SP-Sephadex C-25 (35 x 0,8 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0 bis 0,5 M NaCl in HAc 50%, 0,05 M NaOH
Gradientenvolumen 300 ml, Elutionsgeschwindigkeit 11 ml/h, Fraktionsgröße 2,2 ml,

Tab.9 Aminosäurezusammensetzung der Nebenfraktionen bei der Chromatographie des aminoäthylierten 76-Reste-Bromcyan-peptids B-CB-I(AE) an SP-Sephadex (Abb.17)

Amino- säuren	Peak a	Peak b	Peak c	B-CB-I(AE)
Asp	7,44	8,62	10,79	7
Thr	6,40	6,82	7,77	6
Ser	5,79	6,00	7,83	5
Glu/Hse	14,26	14,22	14,44	13+(1)
Pro	5,67	5,88	6,68	7
Gly	4,59	6,05	8,81	4
Ala	5,27	5,62	6,50	5
AetCys	2,75	3,53	3,94	3
Val	4,13	4,26	4,17	4
Met		0,38	0,51	0
Ile	3,04	3,48	4,38	3
Leu	9,50	10,43	11,80	9
Tyr	0,09	0,65	1,62	0
Phe	3,18	3,15	3,44	3
Lys	2,99	3,55	4,62	3
His	1,06	1,31	1,72	1
Hsl	0,29	0,44	0,65	(1)
Arg	0,97	0,93	0,98	1
Menge ca. (nmol)	85	220	115	(im Hauptgipfel Abb.17,I ca. 590 nmol)

2. Bromcyanspaltung intakten Kallikreins

Neben einem Gehalt von 1,49 μMol an Peptid B-CB-I und 1,11 μMol an B-CB-II erbrachte die quantitative Mengenbestimmung durch Aminosäureanalysen der einzelnen Fraktionen der Abb.16 einen Gehalt von 0,54 μMol an B-CB-III im dritten Gipfel, von 0,42 μMol an B-CB-IV-3 im vierten Gipfel und von 0,55 μMol bzw. 1,08 μMol an B-CB-IV-2 bzw. B-CB-IV-1 im fünften Gipfel des Eluates. Da das 26-Reste-Peptid B-CB-III durch mangelnde Spaltung zwischen B-CB-IV-3 und B-CB-IV-2 zustande kommt, mußte der entsprechende Methioninrest in einem Ausmaß von ca. 50% intakt geblieben sein. Da bei der Bromcyanspaltung der carboxymethylierten Modifikation das Peptid B-CB-III nur in ca. 4% aufgetreten war, lag der Schluß nahe, daß die aminoäthylierte B-Kette zumindest an einzelnen Methioninresten durch Bromcyan schlechter angegriffen wird. Aus diesem Grunde wurde in einem weiteren Versuchsan-satz die bisherige Reihenfolge von Aminoäthylierung und anschließender Bromcyanspaltung umgekehrt und Kallikrein unmittelbar der Bromcyanspaltung unterworfen.

Dazu wurden 13,5 mg NKE-B-KZC 453 in 1,0 ml einer 0,1 molaren Bromcyanlösung in 70%iger Ameisensäure unter N_2 24 h unter Lichtabschluß bei Raumtemperatur inkubiert. Das lyophilisierte Spaltgemisch wurde in 1,5 ml Puffer (6 N GuHCl , 0,66 M Tris/ HCl pH 8,6, 0,01% EDTA) aufgenommen und unter N_2 -Schutz 30 μl Mercaptoäthanol (0,43 μMol) zugesetzt. Nach fünfstündiger Inkubation wurde die Reduktion durch Zugabe von 75 μl Äthylenimin (1,45 μMol) in drei Portionen beendet. Bei der Mengenbestimmung durch die quantitative Aminosäureanalyse ergab sich, daß zur anschließenden Gelfiltration 0,29 μMol des Kallikreinspaltgemisches eingesetzt wurden (Abb.18).

Den weiteren Aminosäureanalysen zufolge fanden sich im ersten Gipfel des Eluates (Abb.18) 0,33 μMol A-Kette, im zweiten Gipfel 0,28 μMol des 76-Reste-Bromcyanpeptides B-CB-I(AE) von ei-

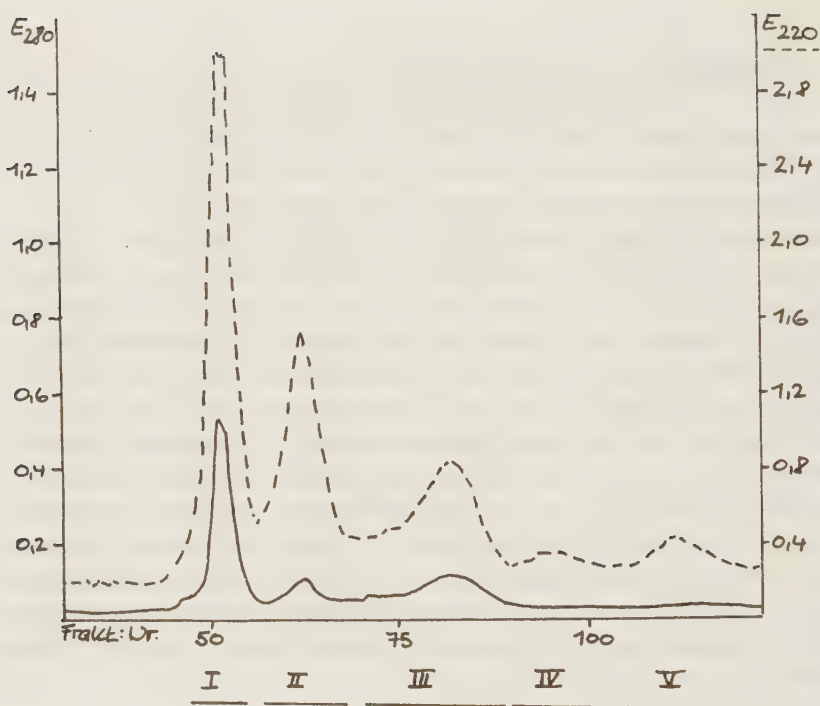


Abb.18 Reduktion und Aminoäthylierung nach vorausgegangener Bromcyanspaltung von 13,5 mg Kallikrein. Auftrennung des Gemisches durch Gelfiltration an Sephadex G-50 (190 x 2 cm) in 0,1 M NH_4HCO_3 -Lösung pH 8,5
Elutionsgeschwindigkeit 19 ml/h, Fraktionsgröße 3,74 ml,

ner Reinheit wie sie vergleichbar auch nach den entsprechenden früheren Aufarbeitungen erhalten worden war ($0,53 \mu\text{Mol Tyr}^1$).

Bei der Chromatographie des so isolierten Peptids B-CB-I(AE) an SP-Sephadex ergab sich ein der Abb.7 gleichendes Elutionsdiagramm. Vor und nach dieser Rechromatographie durchgeführte quantitative Aminosäureanalysen zeigten, daß von 170 nmol an aufgesetztem Peptid B-CB-I(AE) nur ca. 50 nmol an reinem Peptid im Hauptgipfel des Eluates enthalten waren. Die Ausbeute an chromatographisch reinem Peptid B-CB-I(AE) ließ sich somit durch dieses Verfahren der Isolierung, d.h. durch Vorwegnahme der Bromcyanspaltung, nicht steigern, so daß die geschilderte Methode der Peptidgewinnung nicht weiter verfolgt wurde.

3. Tryptische Spaltung von B-CB-I(AE)

Qualitativ

Um sequenatorgerechte Peptide zu erhalten, wurden die wie oben beschrieben isolierten $0,59 \mu\text{Mol}$ an chromatographisch reinem, durch Gelfiltration entsalztem Peptid B-CB-I(AE) mit Trypsin weitergespalten. Nach Zugabe von $2,0 \text{ ml } 0,1 \text{ M NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung bei pH 9 zu der getrockneten Probe bildete sich zunächst ein flockiger Niederschlag, der sich nach ca. 5 min auflöste. Der pH-Wert der Lösung wurde mit Hilfe von Spezialindikatorpapier auf ca. 8 geschätzt. Daraufhin erfolgte in drei Portionen im Abstand von je 30 min die Zugabe von insgesamt $200 \mu\text{l}$ einer $0,1\%$ igen wässrigen Trypsinlösung. Nach insgesamt 90 min wurde die Reaktion durch Zugabe von $400 \mu\text{g SBI}$ in $100 \mu\text{l}$ Wasser beendet. Die Auftrennung des tryptischen Spaltgemisches durch Gelfiltration über Sephadex G-50 fine ist in Abb.19 wiedergegeben. Das Ergebnis entspricht bereits früher erhaltenen Resultaten (vgl. Abb.6).

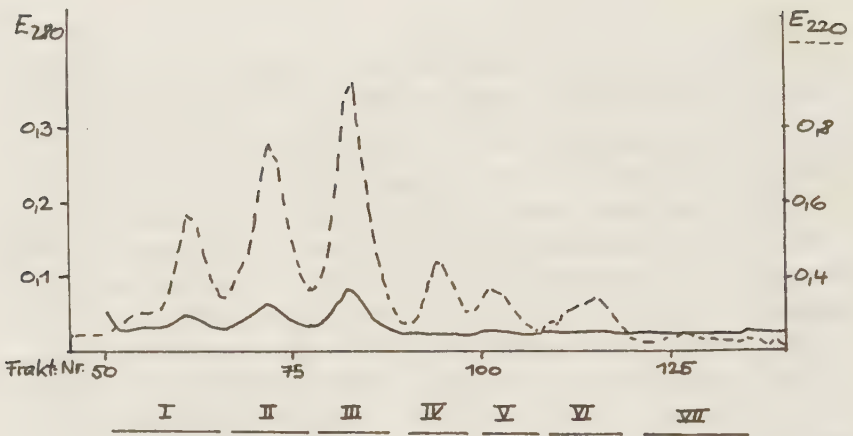


Abb.19 Auftrennung des tryptischen Spaltgemisches aus 0,59 μ Mol chromatographisch reinem aminoäthyliertem 76-Reste-Bromcyanpeptid B-CB-I(AE) durch Gelfiltration an Sephadex G-50 (190 x 2,0 cm) in 0,1 M NH_4HCO_3 -Lösung pH 8,5

Elutionsgeschwindigkeit 20 ml/h, Fraktionsgröße 3,94 ml,

Quantitativ

Um einen Überblick über die quantitativen Verhältnisse im Verlauf einer Versuchsreihe von der Menge an eingesetztem Kallikrein bis hin zu den benötigten tryptischen Peptiden aus aminoäthyliertem B-CB-I(AE) zu erhalten, wurde eine weitere Folge von Versuchen in Angriff genommen, wobei auf den einzelnen Stufen der Peptidisolierung jeweils quantitative Aminosäureanalysen durchgeführt wurden.

Zu diesem Zweck wurden 125,9 mg NKE-B-KZC 453 unter den üblichen Bedingungen mit 112 μ l Mercaptoäthanol (1,59 μ Mol) reduziert und nach 18stündiger Reaktion mit insgesamt 336 μ l Äthylenimin (6,48 μ Mol) umgesetzt. Nach Entsalzung des Gemisches über Sephadex G-25 fine verlief die Kettentrennung durch Gelfiltration über Sephadex G-75 in 50%iger Essigsäure wie bereits mehrfach beschrieben (vgl. Abb.14). Aus den eingesetzten 3,24 μ Mol Kallikrein konnten dabei 2,36 μ Mol (73%) B-Kette gewonnen werden. Anhand des Methioningehaltes des zweiten Gipfels wurde die Menge an B-Kettenbrückstücken auf 0,92 μ Mol berechnet. Nach Abzug einer dieser 0,92 μ Mol B-Kette entsprechenden Aminosäuremenge wurde die Ausbeute an A-Kette zu 2,85 μ Mol bestimmt.

Die so erhaltene aminoäthylierte B-Kette wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht, mit 10 ml 0,1 M Bromcyanlösung in 70%iger Ameisensäure 24 h unter N_2 inkubiert und anschließend gefriergetrocknet. Die Auftrennung von 2,08 μ Mol des Spaltgemisches durch Gelfiltration über Sephadex G-75 in 50%iger Essigsäure lieferte das übliche Elutionsdiagramm (vgl. Abb.7). Mit 2,13 μ Mol an Peptid B-CB-I(AE) und 2,24 μ Mol an B-CB-II(AE) war im Rahmen der Analysengenauigkeit die Ausbeute dabei quantitativ.

Da wie oben beschrieben die Ausbeute an B-CB-I(AE) bei der Chromatographie an SP-Sephadex bereits Gegenstand intensiver Untersuchungen gewesen war, wurde auf diese Reinigungsstufe verzichtet, da wiederum der Verlust von ca. der Hälfte des Materials zu befürchten stand. Zudem war von der Ionenaustauschchromatographie der zu isolierenden tryptischen Peptide ein adäquates Resultat zu erwarten.

Um die Bedingungen der tryptischen Spaltung zu optimieren, wurden zweimal 10% der Gesamtmenge B-CB-I(AE) für Vorversuche verwendet. Die erste Portion wurde aus 400 μ l HAC 50% zur Trockne rotiert und in 1,0 ml Tris/HCl pH 9,0 aufgenommen. Der pH-Wert

der Lösung betrug jetzt 8,97. Nach einstündiger Spaltung mit 50 μ l einer 0,1%igen wässrigen Trypsinlösung wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μ l einer 0,2%igen SBI-Lösung beendet und das Reaktionsgemisch durch Gelfiltration über Sephadex G-50 fine in 0,1 M NH_4HCO_3 -Lösung bei pH 8,5 aufgetrennt. Wie auch in einem zweiten Vorversuch mit der Hälfte an Trypsin unter sonst gleichen Bedingungen erwies sich das Elutionsdiagramm als weitgehend identisch mit dem in Abb.19 dargestellten..

Die quantitative Aminosäureanalyse zeigte, daß für den Hauptversuch noch 1,52 μ Mol an B-CB-I(AE) zur Verfügung standen. Zu dieser Menge, gelöst in 8,0 ml 0,1 M Tris/HCl pH 9, wurden 250 μ l einer 0,1%igen wässrigen Trypsinlösung gegeben und die Reaktion nach 1 h mit der doppelten Menge an SBI beendet. Der gefriergetrocknete Spaltansatz wurde durch Gelfiltration über Sephadex G-50 aufgetrennt (Abb.20). Die einzelnen Fraktionen wurden wie angezeigt vereinigt. Ihre Aminosäurezusammensetzung ist in Tab. 10 wiedergegeben.

Der erste Gipfel enthielt noch 0,31 μ Mol an ungespaltenem Material, im zweiten Gipfel fanden sich 0,80 μ Mol des 46-Reste-Peptids B-CB-I-T-2(AE), im dritten Gipfel 0,33 μ Mol des 34-Reste-Peptids B-CB-I-T-3(AE), das einem 34 Aminosäuren langen aminoterminalen Teilstück des 46-Reste-Peptids entspricht. Das zugehörige 12 Aminosäuren umfassende Peptid B-CB-I-T-5(AE), das der C-terminalen Portion des 46er Peptids entspricht, fand sich mit 0,51 μ Mol im fünften Peak des Eluates. Der vierte Gipfel enthielt 0,84 μ Mol des 15-Reste-Peptids B-CB-I-T-4(AE) und im sechsten Gipfel waren 1,49 μ Mol der beiden Hexapeptide B-CB-I-T-II-1 bzw. -2 enthalten. Die Einordnung dieser einzelnen Peptide in die Gesamtsequenz des Bromcyanpeptids B-CB-I(AE) ist bereits oben erläutert (vgl. Schema 2).

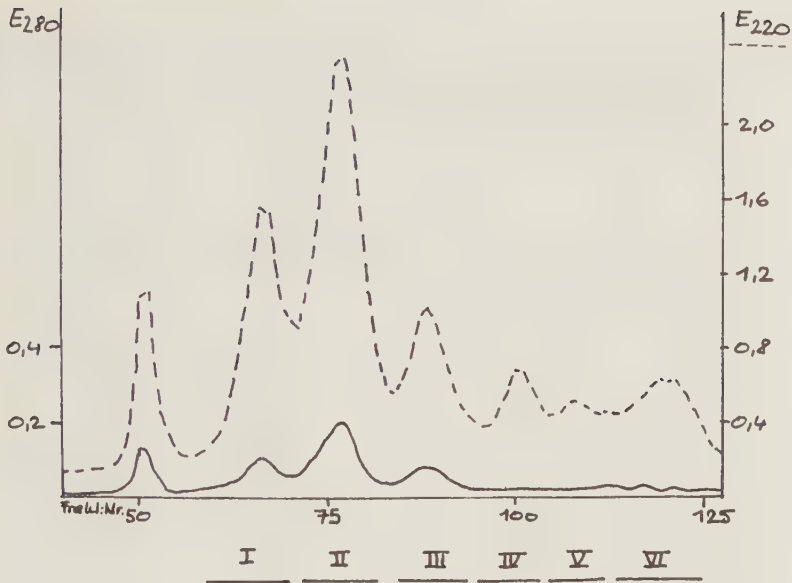


Abb.20. Auftrennung des tryptischen Spaltgemisches aus 1,52 μ Mol nicht chromatographisch gereinigtem B-CB-I(AE) durch Gelfiltration an Sephadex G-50 unter den gleichen Bedingungen wie in Abb.19

Tab.10 Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Fraktionen nach der Auftrennung des tryptischen Spaltgemisches von B-CB-I(AE) durch Gelfiltration (Abb.20)

Amino- säuren	Peak I	B-CB-I	Peak II	B-CB-I- T-2 (AE)
Asp	7,97	7	5,70	6
Thr	5,71	6	3,29	3
Ser	5,29	5	3,22	3
Glu	13,41	13	8,35	8
Pro	6,62	7	4,14	4
Gly	6,12	4	3,52	3
Ala	3,85	5	2,88	3
AetCys	2,33	3	1,91	2
Val	3,51	4	1,94	2
Met		0	0,06	0
Ile	3,18	3	2,03	2
Leu	7,32	9	3,72	3
Tyr	0,60	0	0,06	0
Phe	3,69	3	3,09	3
His	1,42	1	0,99	1
Lys	1,92	3	0,96	1
Arg	0,71	1		0

Tab.10 Fortsetzung

Amino- säuren	Peak III	B-CB-I- T-3 (AE)	Peak IV	B-CB-I- T-4 (AE)
Asp	4,00	4	0,60	0
Thr	2,62	2	2,06	2
Ser	1,97	2	1,27	1
Glu	5,87	7	4,03	4
Pro	2,83	3	2,12	2
Gly	2,75	3	1,54	1
Ala	1,22	1	0,35	0
AetCys	1,48	2	1,10	1
Val	1,07	1	1,06	1
Met		0		0
Ile	2,12	2	0,21	0
Leu	3,45	3	2,98	3
Tyr	0,45	0		0
Phe	2,29	3		0
His		0		0
Lys	0,38	0		0
Arg		0		0

Tab.10 Fortsetzung

Amino- säuren	Peak V ¹⁾	B-CB-T- T-5 (AE)	Peak VI	B-CB-I- T-II-1 + B-CB-I- T-II-2
Asp	2,98	2	1,62	1
Thr	2,28	1	1,18	1
Ser	2,20	1	1,32	1
Hse	0,52	(1)	0,11	0
Glu	3,32	1	1,19	1
Pro	2,43	1	1,20	1
Gly	2,13	0	0,85	0
Ala	2,20	2	2,11	2
AetCys	0,91	0	0,27	0
Val	1,54	1	0,99	1
Met	0,27	0		0
Ile	0,60	0	1,01	1
Leu	2,72	0	1,59	1
Tyr	0,47	0	0,33	0
Phe				0
His	1,00	1	0,19	0
Hsl	0,63	(1)	0,13	0
Lys	1,28	1	2,52	2
Arg		0	0,18	0

¹⁾ basiert auf His = 1,00

Chromatographische Reinigung

B-CB-I-T-2 (AE)

Da zum Zweck einer möglichst vollständigen Sequenzierung größerer Peptide hohe Reinheit erforderlich ist, wurde im Folgenden versucht, diese durch Ionenaustauschchromatographie der entsprechenden tryptischen Fragmente zu erreichen.

Bei der zunächst durchgeführten Chromatographie des entsprechend Abb.20 isolierten 46-Reste-Peptids B-CB-I-T-2(AE) an QAE-Sephadex A-25 mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0,05 M bis 1,5 M TEAA bei pH 6,0 ergab sich eine Auftrennung in drei proteinhaltige Gipfel. Jedoch ließ die Aminosäurezusammensetzung dieser drei Fraktionen gegenüber jener des Ausgangsmaterials keinen Reinigungseffekt erkennen.

Die Chromatographie einer weiteren Portion dieses Materials an SP-Sephadex C-25 (Abb.21) führte zu einer Auftrennung in zwei Peaks mit sehr ähnlicher Aminosäurezusammensetzung (Tab.11). Da in dem verwendeten System der Ionenaustauschchromatographie Peptide entsprechend der Anzahl ihrer positiven Ladungen eluiert werden sollten, läßt der Aminosäuregehalt beider Materialien keinen Grund für die beobachtete Auftrennung erkennen, so daß zur weiteren Aufarbeitung beide Fraktionen vereinigt wurden. Das Auftreten einiger weiterer kleinerer Peaks im Eluat läßt die Abtrennung von Nebenprodukten vermuten, so daß diese Chromatographie an SP-Sephadex für die Gewinnung des 46-Reste-Peptids B-CB-I-T-3(AE) in sequenatorgeeigneter Reinheit angeraten sein dürfte.

B-CB-I-T-3 (AE)

Im Gegensatz zum 46-Reste-Peptid lieferte die Chromatographie des 34-Reste-Peptids B-CB-I-T-3(AE) an QAE-Sephadex A-25 ein deutlich günstigeres Ergebnis. Zwei Ansätze dieser Art ergaben

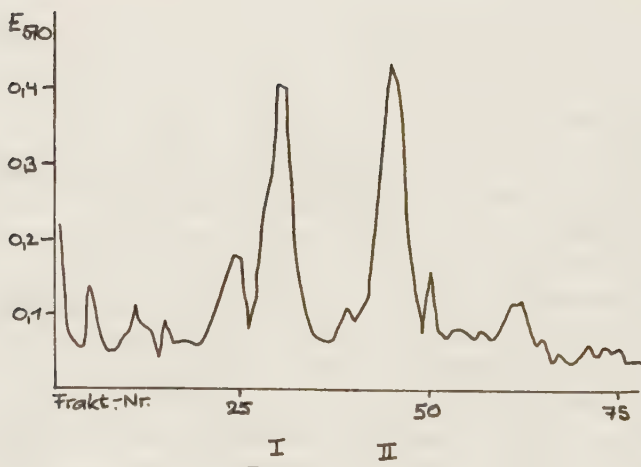


Abb.21 Chromatographie von 1/10 des Materials aus dem 2.Gipfel der Abb.20 an SP-Sephadex C-25 (35 x 0,8 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0 bis 0,5 M NaCl in HAc 50%, 0,05 M NaOH

Gradientenvolumen 300 ml, Elutionsgeschwindigkeit 14 ml/h, Fraktionsgröße 1,74 ml, davon 0,5 ml für die Ninhydrindetektion eingesetzt,

eine reproduzierbare Auftrennung des Materials in zwei proteinhaltige Peaks (Abb.22), deren Aminosäurezusammensetzung in Tab. 12 wiedergegeben ist. Ein klarer Unterschied in der Aminosäurezusammensetzung beider Fraktionen ist auch hier nicht ersichtlich. Jedoch verwundert hier dieses Verhalten im Gegensatz zu dem in

Tab.11 Aminosäurezusammensetzung von B-CB-I-T-2 (AE)
nach der Chromatographie an SP-Sephadex
(Abb.21)

Amino- säuren	Peak I	Peak II	Reste ganzzahlig
Asp	5,84	5,90	6
Thr	2,92	3,41 ¹⁾	3
Ser	3,12	2,75 ¹⁾	3
Hse	0,21	0,55	(1)
Glu	7,50	7,93	8
Pro	3,62	2)	4
Gly	3,37	3,25	3
Ala	2,97	2,96	3
AetCys	2,02	2,20	2
Val	1,83	1,89	2
Ile	1,80	1,93	2
Leu	3,04	2,95	3
Phe	3,20	2,87	3
His	1,20	1,04	1
Hsl	0,54	0,44	(1)
Lys	0,98	1,07	1

1) schlecht getrennt

2) nicht bestimmt

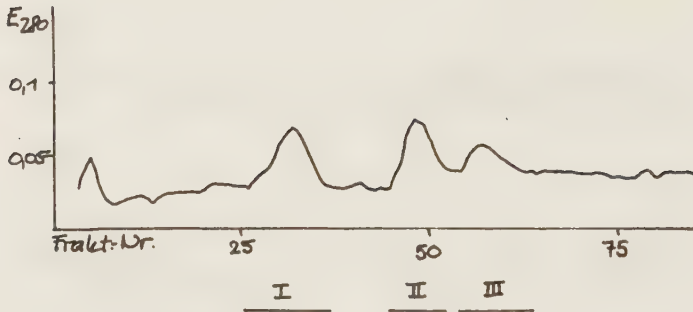


Abb.22 Chromatographie von B-CB-I-T-3(AE) (aus dem 3.Gipfel der Abb.20) an QAE-Sephadex A-25 (35 x 0,8 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0,05 M bis 1,5 M TEAA pH 6,0

Gradientenvolumen 300 ml, Elutionsgeschwindigkeit 20 ml/h, Fraktionsgröße 1,93 ml,

Abb.21 beschriebenen stark sauren Chromatographiesystem nicht, da bei dieser Chromatographie an einem Anionenaustauscher bei fast neutralem pH-Wert Unterschiede zwischen amidhaltigen und deamidierten Peptidformen zu Heterogenitäten führen können, die in der Aminosäureanalyse nicht zu erfassen sind.

B-CB-I-T-5(AE)

Ein für die Aufklärung der Gesamtsequenz von B-CB-I(AE) sehr wesentliches Bruchstück stellt das tryptische 12-Reste-Peptid B-CB-I-T-5(AE) dar. Es umfaßt die zwölf carboxyterminalen Aminosäuren des 76-Reste-Bromcyanpeptids. Da bei der Trypsinspaltung von B-CB-I(AE) der Aminoäthylcysteinrest 64 (vgl. Schema 2) nur in einem Ausmaß von ca. 50% angegriffen wird (vgl. Abb. 20), läßt sich dieses Peptid nur in verhältnismäßig geringer Menge isolieren. Hinzu kommt, daß die vollständige Abtrennung von dem Peptid B-CB-I-T-4(AE), das mit 15 Aminosäuren eine sehr

Tab.12 Aminosäurezusammensetzung von B-CB-I-T-3(AE) nach der Rechromatographie an QAE-Sephadex (Abb.22)

Amino- säuren	Peak II	Peak III	Reste ganzzahlig
Asp	3,91	3,94	4
Thr	1,93	1,99	2
Ser	2,22	2,31	2
Glu	6,82	6,73	7
Pro	2,90	2,87	3
Gly	3,12	3,20	3
Ala	1,11	1,16	1
AetCys	2,17	2,04	2
Val	0,95	0,92	1
Met			0
Ile	1,92	1,87	2
Leu	2,93	2,85	3
Tyr			0
Phe	2,84	2,75	3
His			0
Lys			0
Trp ¹⁾	0,74	0,92	1

1) aus E₂₈₀

ähnliche Größe aufweist, allein durch die Gelfiltration kaum zu erreichen ist.

Mit zwei Asx-, einem Lys- und einem His-Rest schien bei pH 6,0 eine neutrale bis leicht positive Ladung dieses Peptids wahrscheinlich, so daß wir zunächst die Rechromatographie eines Drittels der entsprechend Abb.20 erhaltenen Menge an diesem Peptid an CM-Sephadex mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0,05 bis 1,5 M TEAA durchführten. Die starke Anfärbung der ersten Fraktionen des Eluates mit Ninhydrin zeigte jedoch, daß das eingesetzte Material die Säule ohne Adsorption an das Gel passiert haben mußte.

Da die C-terminale Stellung von B-CB-I-T-5(AE) innerhalb des 76-Reste-Bromcyanpeptides aufgrund des pH-abhängigen Gleichgewichts zwischen Homoserin und Homoserinlacton zusätzliche Heterogenität erwarten ließ, wurde für einen weiteren Versuch die Hälfte der verbliebenen Peptidmenge zur Öffnung des Lactonringes drei Stunden bei Raumtemperatur in 20 ml einer 0,1 M NH_4HCO_3 -Lösung bei pH 9,0 inkubiert.

Das anschließend gefriergetrocknete Material wurde der Ionenaustauschchromatographie an QAE-Sephadex A-25 mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0,05 M bis 1,5 M TEAA bei pH 6,0 unterzogen. Die Ninhydrinfärbung der Fraktionen des Eluates ergab eine Auftrennung in drei Gipfel (Abb.23). Aufgrund des hohen Salzgehaltes der zur Aminosäureanalyse eingesetzten Proben ließen sich diese nicht quantitativ auswerten, so daß hier auf eine Wiedergabe verzichtet wird. Die Abschätzung des Gehalts an einzelnen besonders charakteristischen Aminosäuren (z.B. Histidin) zeigte jedoch, daß sich das 12-Reste-Peptid B-CB-I-T-5(AE) in zwei vergleichbar große Gipfel aufgetrennt hatte, deren erster beim Ausschlußvolumen der Säule eluiert, d.h. unter diesen Bedingungen nicht adsorbiert worden war. Beim Material des dritten Gipfels handelte es sich dem Aminosäure-

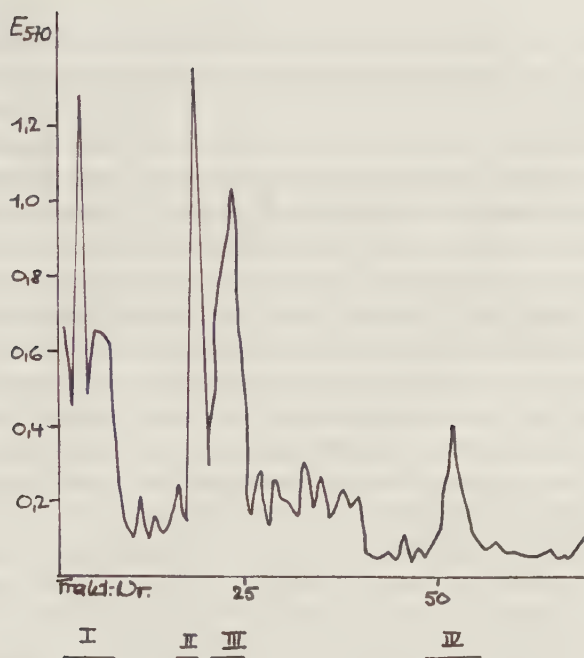


Abb.23 Chromatographie von Material aus dem Gipfel V der Abb.20 an QAE-Sephadex A-25 (35 x 0,8 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0,05 M bis 1,5 M TEAA pH 6,0

Gradientenvolumen 350 ml, Elutionsgeschwindigkeit 19,4 ml/h, Fraktionsgröße 1,93 ml, davon je 1,0 ml zur Ninhydrindetektion verwendet,

gehalt zufolge um restliches 15-Reste-Peptid B-CB-I-T-4(AE), das bei der Gelfiltration nicht vollständig abgetrennt worden war.

Da somit bei pH 6,0 zumindest jeweils ein Teil des Materials an kationischen wie an anionischen Austauschern nicht adsorbiert worden war und demzufolge bei diesem pH-Wert in ungeladenem Zustand vorliegen mußte, wurde im weiteren der Versuch unternommen, die positive Ladung des Peptids durch Senkung des pH-Wertes auf 4,5 (His) zu erhöhen. Durch Verwendung eines stärker sauren Ionenaustauschers (SP-Sephadex anstelle von CM-Sephadex) und eines flacheren Konzentrationsgradienten (0,05 M bis 0,5 M) sollte zusätzlich die Bindungsstärke und die Trennschärfe erhöht werden. Das Ergebnis dieses Ansatzes, der mit dem letzten Drittel des entsprechend Abb.20 gewonnenen Materials durchgeführt wurde, ist in Abb.24 dargestellt.

Den Aminosäureanalysen (Tab.13) zufolge handelt es sich beim Material des ersten Gipfels um das als Verunreinigung vorhandene 15-Reste-Peptid B-CB-I-T-4(AE), das Material des zweiten und des dritten Gipfels enthielt das gewünschte 12-Reste-Peptid B-CB-I-T-5(AE) in der erforderlichen Reinheit. Die chromatographische Heterogenität dieses Materials ließ wiederum an eine teilweise Deamidierung eines oder beider Asx-Reste denken.

Nachdem das für die tryptische Spaltung (Abb.20) eingesetzte Bromcyanpeptid B-CB-I(AE) vorher nicht chromatographisch gereinigt worden war, wunderte es nicht, daß sich der vierte Gipfel der Abb.24 als geringe Menge eines Peptids interpretieren ließ, das in der Gesamtsequenz der B-Kette (vgl. Schema 3) die 14 Aminosäurereste zwischen Cys 75 und Cys 89 umfaßt, also einem C-terminal um 2 Aminosäuren verlängerten B-CB-I-T-5(AE) entspricht.

Da die Auftrennung der beiden Hexapeptide B-CB-I-T-II-1 und -2 und des Tripeptids B-CB-I-T-I sowie die Chromatographie des 15-

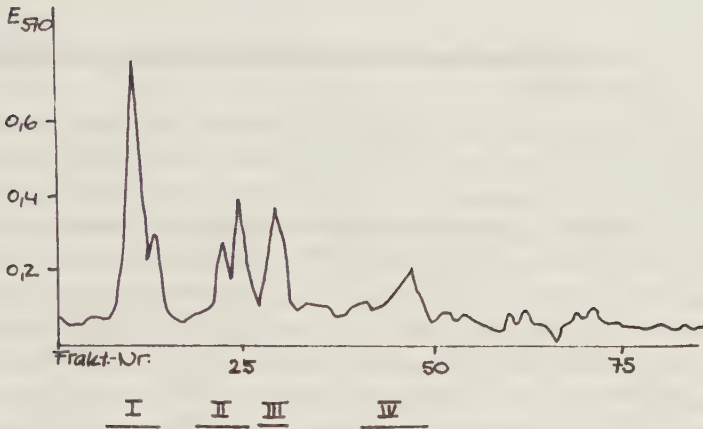


Abb.24 Chromatographie von Material aus dem 5. Gipfel der Abb.20 an QAE-Sephadex A-25 (35 x 0,8 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0,05 M bis 0,5 M TEAA pH 4,5
Gradientenvolumen 300 ml, Elutionsgeschwindigkeit 18,9 ml/h, Fraktionsgröße 1,89 ml, Probenahme für die Ninhydrindetektion 0,7 ml/Fraktion,

Reste-Peptids B-CB-I-T-4 bereits früher beschrieben worden war (28), ermöglichen die bislang beschriebenen Resultate die ionenaustauschchromatographische Reinigung aller sieben bei der tryptischen Spaltung des aminoäthylierten 76-Reste-Bromcyanpeptides B-CB-I(AE) anfallenden Fragmente.

Tab.13 Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Fraktionen der Abb.24

Aminosäuren	Peak I	B-CB-I-T-4 (AE)	Peak II	Peak III	B-CB-I-T-5 (AE)
Asp	0,29	0	1,90	2,02	2
Thr	1,78	2	1,01	1,18	1
Ser	1,08	1	0,98	0,93	1
Hse		0	0,42	0,38	(1)
Glu	1)	4	1,16	0,95	1
Pro	2,21	2	1,04	0,82	1
Gly	1,53	1	0,34	0,41	0
Ala	0,05	0	1,79	1,88	2
AetCys	1,02	1	0,06	0,05	0
Val	1,08	1	1,00	1,17	1
Ile	0,11	0	0,16	0,41	0
Leu	1)	3	0,23	0,18	0
Tyr		0			0
Phe		0			0
Lys		0	1,06	1,17	1
Hsl		0	0,44	0,36	(1)
His		0	0,89	0,82	1

1) zu viel Material

4. Tryptische Spaltung aminoäthylierter B-Kette

Nachdem die bislang ermittelte Aminosäuresequenz der B-Kette in der Pos.89, also zwei Reste C-terminal von Met 87 (vgl. Schema 1), einen Cysteinrest aufwies, war zu vermuten, daß nach einer direkten tryptischen Spaltung aminoäthylierter B-Kette ohne vor-
ausgehende Fragmentierung durch Bromcyan einige Peptide denen der tryptischen Spaltung von B-CB-I(AE) stark ähneln würden. So war anstelle des 46-Reste-Peptids B-CB-I-T-2(AE) ein 48 Aminosäuren umfassendes Bruckstück zu erwarten, das sich nur durch die C-terminale Sequenz -Met-Leu-AetCys anstelle des carboxyl-
endständigen Homoserins von jenem unterscheiden sollte. Das gleiche C-terminale Tripeptid sollte ein zu erwartendes 14-Reste-Fragment von dem ansonsten identischen 12-Reste-Peptid B-CB-I-T-5(AE) unterscheiden. Beide Bruckstücke sollten den Pos.42 bis 89 bzw. 75 bis 89 der B-Kette entsprechen (vgl. Schema 2).

Da die unmittelbare tryptische Spaltung der aminoäthylierten B-Kette ohne vorhergehende Isolierung der Bromcyanpeptide ein wesentlich komplexeres Gemisch von Peptiden ergeben sollte als die tryptische Spaltung des 76-Reste-Peptids B-CB-I(AE), war bislang von einem solchen Vorgehen Abstand genommen worden. Andererseits hatte die Isolierung jeweils reiner Peptide in einer stufenweisen Abfolge, wie sie bisher beschrieben wurde, bei hohem Zeitaufwand nur eine geringe Ausbeute der benötigten Fragmente erbracht. Da sämtliche möglichen tryptischen Peptide nun anhand der bisherigen Versuche bzw. der bekannten Teilsequenzen zu charakterisieren sein sollten, wurde im Folgenden der Versuch unternommen, die restlichen für die Aufklärung der Aminosäuresequenz des Kallikreins erforderlichen Peptide auf dem skizzierten direkten Weg einfacher und möglicherweise in höherer Ausbeute zu erhalten.

Wie oben bereits beschrieben (vgl. Abb.13) war es gelungen, ca. 0,6 µMol chromatographisch reine aminoäthylierte B-Kette zu iso-

lieren. Nach Entsalzung dieses Materials durch Gelfiltration über Sephadex G-25 in 50%iger Essigsäure wurde die am Rotationsverdampfer getrocknete Probe in 3,0 ml 0,2 M Tris/HCl pH 9,4 aufgenommen. Dabei ergab sich eine flockige Suspension mit einem pH-Wert zwischen 4 und 5. Die Zugabe von 1,0 ml einer 0,5 M Tris/HCl-Lösung pH 9,4 erhöhte den pH-Wert auf 7,5 wobei das Material in Lösung ging. Nach Zugabe von weiteren 2,5 ml des gleichen Tris-Puffers hatte der pH-Wert 8,5 und nach nochmals 0,9 ml eines 2 M Tris/HCl-Puffers gleichen pH-Wertes endlich 9,0 erreicht. Dazu wurden 100 μ l einer 0,2%igen wässrigen Trypsinlösung gegeben, die Lösung 1 h bei 25°C inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von 500 μ g SBI beendet und anschließend das Gemisch durch Gelfiltration über Sephadex G-50 aufgetrennt. Das Elutionsdiagramm zeigte fünf Gipfel (Abb.25), deren weitere Aufarbeitung im Folgenden beschrieben wird.

B-T-I

Das Material des ersten Gipfels, das seiner Elutionsposition zufolge die größten entstandenen Peptide enthalten sollte, erwies sich bei der Chromatographie an QAE-Sephadex als sehr heterogen (Abb.26). Während die Aminosäurezusammensetzung der Gipfel I, II und IV keine eindeutige Interpretation zuließ, entsprach der Aminosäuregehalt des Gipfels III einem 63-Reste-Peptid, das die Pos.27-89 der B-Kette umfassen, d.h. durch Spaltung an Lys 26 und AetCys 89 zustande gekommen sein mußte (Tab.14). Die geringe Ausbeute von nur 20 nmol und die mangelnde Reinheit machten jedoch eine präparative Nutzung unmöglich. So blieb der Schluß zu ziehen, daß in Peak I der Abb.25 eine Reihe von Peptiden ähnlicher Größe in jeweils sehr geringen Mengen enthalten sein mußte.

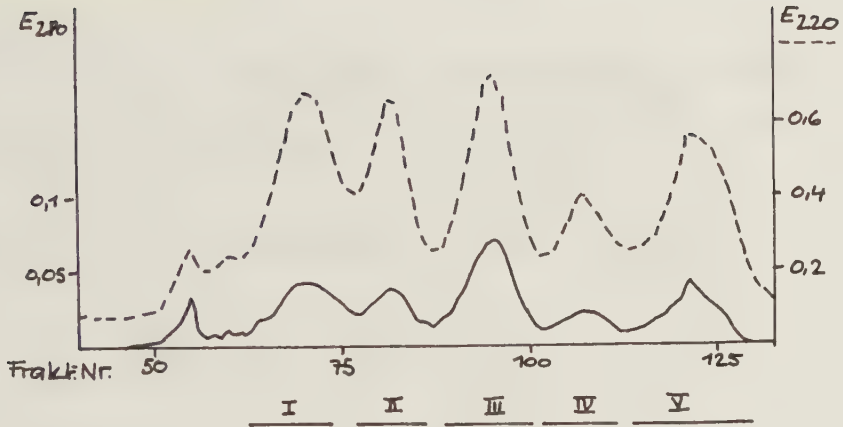


Abb.25 Auftrennung des tryptischen Spaltgemisches von 0,6 μMol aminoäthylierter B-Kette durch Gelfiltration an Sephadex G-50 fine (190 x 2,0 cm) in 0,1 M NH_4HCO_3 -Lösung pH 7,5

Elutionsgeschwindigkeit ca. 20 ml/h, Fraktionsgröße 3,3 ml,

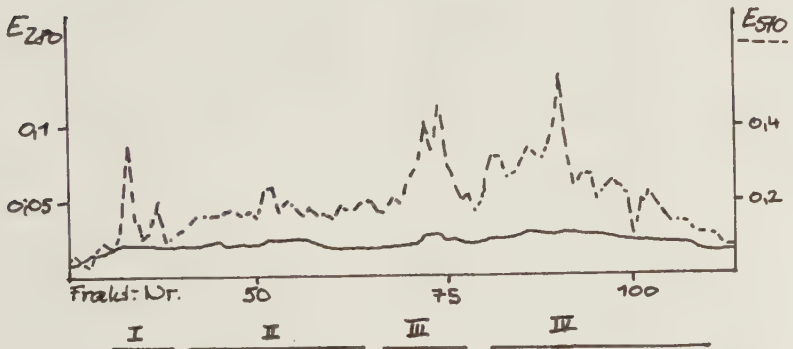


Abb.26 Chromatographie des Gipfels I der Abb.25 an QAE-Sephadex A-25 (35 x 0,8 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0,05 M bis 1,0 M TEAA pH 6,0

Gradientenvolumen 300 ml, Elutionsgeschwindigkeit 16,2 ml/h, Fraktionsgröße 1,34 ml, zur Ninhydrindetektion eingesetzt: 0,4 ml/Fraktion,

Tab.14 Aminosäurezusammensetzung des Gipfels III der Abb.26
und des Gipfels II der Abb.25

Amino- säuren	Abb.26 III	Pos.27-89 der B-Kette	Abb.25 II	Pos.41-89 der B-Kette
Asp	6,34	6	6.32	6
Thr	4,77	5	3.40	3
Ser	4,12	4	3.13	3
Glu	11,24	12	8.13	8
Pro	(3,81)	6	4.50	4
Gly	(5,35)	4	3.76	3
Ala	3,27	3	2.91	3
AetCys	3,59	4	2.89	3
Val	2,63	3	1.83	2
Met	1,15	1	0.97	1
Ile	2,12	2	2,31	2
Leu	6,13	7	4,45	4
Tyr	0,24	0	0,27	0
Phe	2,86	3	2,78	3
Lys	1,04	1	0,99	1
His	1,07	1	0,97	1
Arg		0		0
Trp		1		1

B-T-II

Ein ganz anderes Bild ergab sich bei der Aufarbeitung des zweiten Gipfels dieser Trypsinspaltung aminoäthylierter B-Kette. Bereits die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung (Tab.14) wies auf ein einheitliches Peptid mit 48 Resten (bezeichnet als B-T-II), das wie eingangs erwähnt, in dieser Form zu erwarten gewesen war. Mit ca. 0,1 - 0,15 μMol (ca. 20%) befand sich die Gesamtausbeute an B-T-II in etwa im gleichen Bereich wie jene des korrespondierenden 46-Reste-Peptids B-CB-I-T-2(AE) nach einem wesentlich aufwendigeren Isolierungsschema.

Da zu erwarten stand, daß die C-terminale Region dieses 48-Reste-Peptids B-T-II, d.h. vor allem die Sequenz zwischen AetCys 75 und Lys 82 (vgl. Schema 1) beim weiteren Edmanabbau die größten Probleme bieten würde, schien es sehr wesentlich, ein Peptid zu isolieren, das für die Aufklärung dieses Teilstücks geeignet sein würde. Es sollte sich dabei um jenes 14-Reste-Peptid handeln, das von der Spaltung an AetCys 75 und AetCys³⁹ zu erwarten war. Abgesehen von der C-terminalen Sequenz -Met-Leu-AetCys sollte seine Zusammensetzung identisch mit jener des 12-Reste-Peptids B-CB-I-T-5(AE) sein. Wie dort war hier ebenfalls zu vermuten, daß die Peptidbindung des Aminoäthylcysteinrestes 75 nur schlecht, jene des Lysinrestes 82 praktisch nicht zu spalten war.

Obwohl mit ca. 100 nmol B-T-II nur eine verhältnismäßig geringe Menge an diesem Peptid zur Verfügung stand, unternahmen wir wegen der geschilderten wesentlichen Bedeutung des 14-Reste-Peptids den Versuch, dieses durch eine weitere tryptische Spaltung von B-T-II zu gewinnen. Dazu wurde das entsprechend Abb.25,II erhaltene Material in 0,3 ml Puffer (Tris/HCl pH 9,0) aufgenommen, 10 μl einer 0,3%igen wässrigen Trypsinlösung zugesetzt, die Reaktion nach zwei Stunden durch Zugabe von 120 μg SBI beendet und das Gemisch anschließend durch Gelfiltration über Sephadex G-50 aufgetrennt (Abb.27). Die resultierenden drei Gipfel wur-

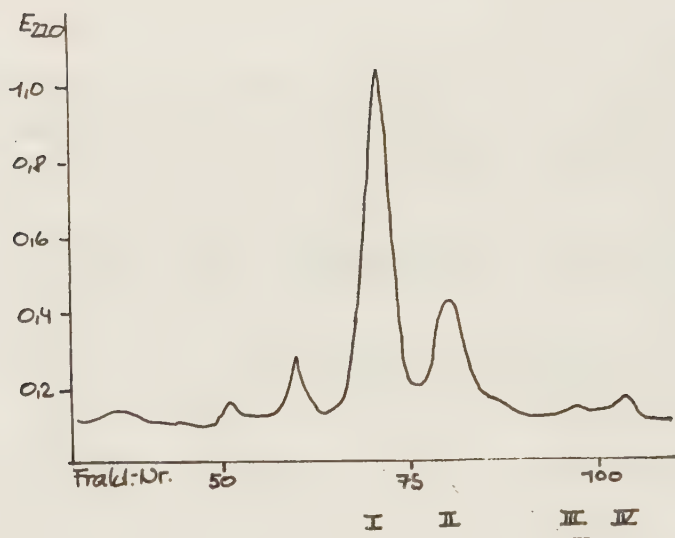


Abb.27 Auftrennung des Spaltgemisches der tryptischen Nachspaltung des Peaks II der Abb.25 an Sephadex G-50 fine (140 x 1,5 cm) in 0,1 M NH_4HCO_3 -Lösung pH 8
Elutionsgeschwindigkeit ca. 15 ml/h, Fraktionsgröße 1,8 ml

den wie angezeigt vereinigt und ihre Aminosäurezusammensetzung bestimmt. Demnach dürfte es sich bei Peak I und II erwartungsgemäß um ungespaltenes 48-Reste-Peptid B-T-II bzw. um dasjenige 34-Reste-Peptid handeln, das - entstanden durch Spaltung an AetCys 41 und AetCys 75 - identisch mit dem Peptid B-CB-I-T-3 (AE) sein mußte. Beide Fragmente waren jedoch von mangelnder Reinheit, so daß hier auf eine Wiedergabe der ohnehin bekannten

Zusammensetzung verzichtet wird. Der Gipfel IV schließlich enthielt das gesuchte 14-Reste-Peptid (benannt als B-T-II-T-2), dessen Aminosäurezusammensetzung in Tab.15 wiedergegeben ist. Mit Ausnahme eines etwas zu niedrigen Gehalts an Alanin entspricht der Aminosäuregehalt dieses Materials der erwarteten Zusammensetzung.

Da die Menge an ungespaltenem 48-Reste-Peptid bei dem eben beschriebenen Versuch immer noch recht hoch gewesen war (vgl. Abb. 27), wurde mit diesem Material nochmals eine intensive tryptische Spaltung durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die lyophilisierte Probe in 0,25 ml Puffer (0,1 M Tris/HCl pH 8,5, 1 mM CaCl_2) aufgenommen, mit 50 μg Trypsin 4 h bei 37°C inkubiert, dann nochmals 50 μg Trypsin zugesetzt, nach einer Reaktionszeit von insgesamt 8 h bei 37°C die Spaltung durch Zugabe von 200 μg SBI beendet und die Produkte anschließend durch Gelfiltration über Sephadex G-50 aufgetrennt (Abb.28).

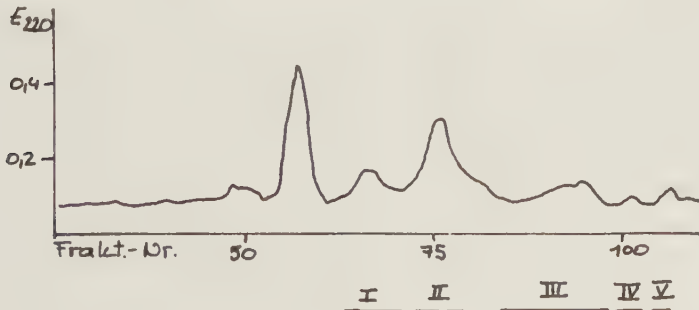


Abb.28 Tryptische Weiterspaltung des Gipfels I der Abb.27. Auftrennung durch Gelfiltration unter den gleichen Bedingungen wie in Abb.27

Tab.15 Aminosäurezusammensetzung des tryptischen 14-Reste-Peptids B-T-II-T-2 (Abb.27 VI)

Amino- säuren		Pos.76-89 der B-Kette
Asp	2,31	2
Thr	1,07	1
Ser	1,02	1
Glu	1,34	1
Pro	1,31	1
Gly	0,52	0
Ala	1,27	2
AetCys	0,98	1
Val	0,93	1
Met	0,95	1
Ile		0
Leu	1,04	1
Tyr		0
Phe		0
Lys	0,93	1
His	0,94	1
Arg		0

In Analogie zu den bisherigen Ergebnissen läßt sich das in Abb. 28 dargestellte Elutionsdiagramm wie folgt interpretieren: Der erste Gipfel mit dem Maximum bei Fraktion 57 dürfte dem eingesetzten Trypsin und SBI, der Peak I restlichem 48-Reste-Peptid B-T-II, der Peak II dem entstandenen 34-Reste-Peptid und der Peak IV dem 14-Reste-Peptid B-T-II-T-2 entsprechen. Unter dieser Voraussetzung ließ das Elutionsdiagramm darauf schließen, daß durch die angewandte wesentlich intensivere Methode der Trypsinbehandlung von B-T-II durchaus noch ein beträchtlicher Prozentsatz an weiterer Spaltung zu erreichen ist. Da zum Sequenatorabbau eines derart kleinen Peptids wie B-T-II-T-2 geringe Materialmengen genügen, könnten bei der analogen Aufarbeitung eines präparativen Ansatzes durchaus hinreichende Mengen des auf die beschriebene Weise recht einfach zugänglichen Peptids zu isolieren sein.

B-T-III und IV

Im Gegensatz zum Gipfel B-T-IV, dessen Aminosäurezusammensetzung nicht eindeutig zu interpretieren war, erwies sich der 3. Gipfel der Abb. 25 als Material ziemlich einheitlicher Zusammensetzung. Die Bestimmung des Aminosäuregehaltes von B-T-III zeigte, daß es sich dabei um ca. 0,3 μ Mol des C-terminalen 16-Reste-Peptids B-CB-II-T-1 der B-Kette handeln mußte. Da dieses Peptid den gesamten Kohlehydratanteil der B-Kette enthält, konnte es nicht verwundern, daß dieses Material bei der Gelfiltration unmittelbar anschließend an das 48-Reste-Peptid B-T-II eluiert worden war. Entsprechend den Elutionsdiagrammen früherer analoger Gelfiltrationen (vgl. Abb. 19, 20) wäre jedoch an dieser Stelle zusätzlich das 34-Reste-Peptid zu erwarten gewesen, das jedoch in B-T-III nicht aufzufinden war.

B-T-V

Auf Grund seiner Elutionsposition stand zu erwarten, daß der fünfte Gipfel der in Abb.25 dargestellten Auftrennung des tryptischen Spaltgemisches aminoäthylierter B-Kette eine Reihe von kleineren Peptiden enthalten sollte. Damit war zu vermuten, daß sich auch das für die Sequenzierung benötigte 14-Reste-Peptid B-T-II-T-2 darin befinden würde. Allerdings bildete bereits das Fehlen des zu B-T-II-T-2 komplementären 34-Reste-Peptids bei den bisherigen Untersuchungen einen Hinweis darauf, daß das 14-Reste-Peptid unter den angegebenen milden Bedingungen der tryptischen Spaltung möglicherweise gar nicht entstanden war. Da dieses B-T-II-T-2 entsprechend seiner Aminosäurezusammensetzung bei pH 4,5 (s.u.) in jedem Fall eine positive Nettoladung tragen sollte, wurde zur Klärung dieser Frage der Gipfel B-T-V durch Ionenaustauschchromatographie an SP-Sephadex in einzelne Bestandteile aufgetrennt (Abb.29).

Da wie eben gesagt das gesuchte 14-Reste-Peptid eine positive Ladung tragen mußte, wurden nur jene Fraktionen des Eluates untersucht, die unter den angegebenen Bedingungen an SP-Sephadex adsorbiert wurden, also positiv geladen waren. Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung (Tab.16) zeigte, daß der Gipfel a 35 nmol jenes N-terminalen 14-Reste-Peptids der B-Kette - entstanden durch Spaltung an Arg 14 - enthalten mußte, das bereits früher nach der tryptischen Spaltung aminoäthylierter und maleylierter B-Kette als Peptid B(AE,mal)-T-II erhalten worden war.

Der Peak b enthielt 72 nmol desselben Peptids (Tab.16), dessen Abtrennung vom ersten Gipfel auf Grund der bekannten Aminosäuresequenz (Pos. 1 - 14) nicht zu erklären war.

Die Aminosäurezusammensetzung des Gipfels c wies diesen als das ebenfalls bereits früher nach der tryptischen Spaltung des carb-oxy-methylierten Bromcyanpeptids B-CB-I isolierte Hexapeptid B-CB-I-T-II-2 in einer Menge von 85 nmol aus.

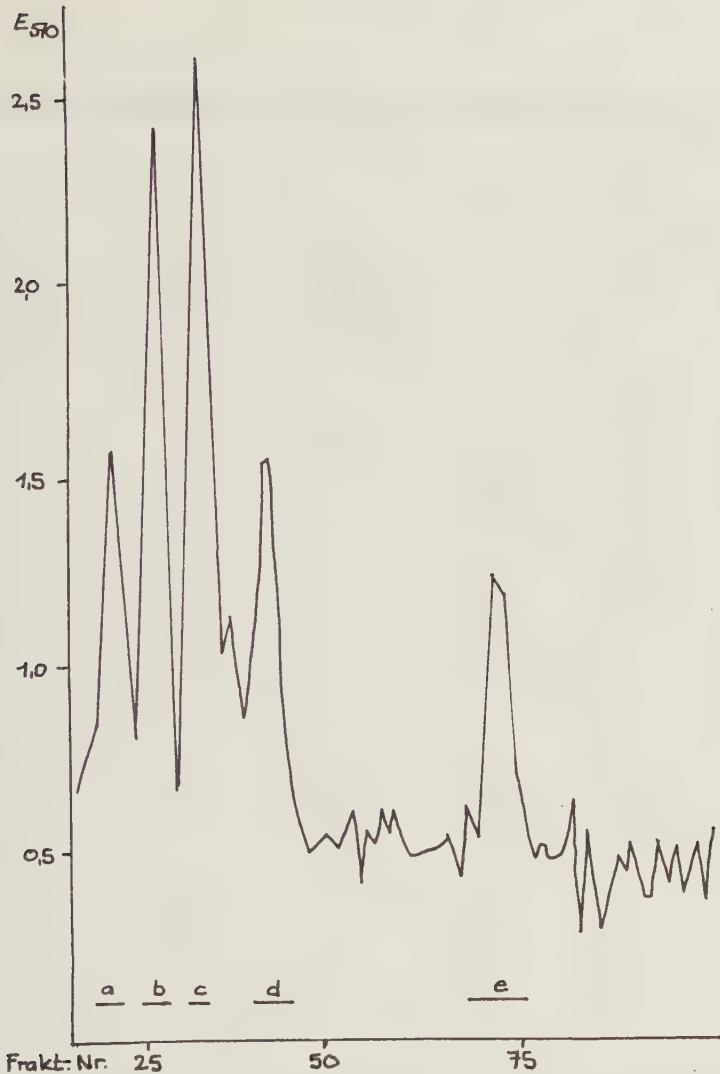


Abb.29 Chromatographie des Gipfels V der Abb.25 an SP-Sephadex C-25 (36 x 0,9 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0,05 M bis 0,5 M TEAA pH 4,5

Gradientenvolumen 380 ml, Elutionsgeschwindigkeit 12 ml/h, Probenahme für Ninhydrindetektion 0,4 ml/Fraktion

Tab.16 Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Fraktionen
der Abb.29

Amino- säuren	Peak a	Peak b	B(AE,mal) -T-II Pos.1-14 d.B-Kette	Peak c	B-CB-I- T-II-2 Pos.15-20 d.B-Kette
Asp	2,99	3,05	3		0
Thr			0		0
Ser	1,06	1,02	1	0,93	1
Glu			0	1,18	1
Pro			0	1,05	1
Gly	1,14	1,15	1		0
Ala	1,00	0,96	1	1,01	1
AetCys			0		0
Val			0		0
Met	0,41	0,63	1		0
Ile			0		0
Leu	2,77	2,86	3	0,89	1
Tyr	0,92	0,97	1		0
Phe			0		0
Lys	1,00	0,98	1	0,96	1
His	1,01	0,98	1		0
Arg	0,95	0,97	1		0
Trp			0		0

Tab.16 Fortsetzung

Amino- säuren	Peak d	Pos.90-100 d. B-Kette	Peak e	Pos.126-136 d. B-Kette
Asp	1,15	1	1,00	1
Thr	0,99	1	1,01	1
Ser		0	1,92	2
Glu		0		0
Pro	1,29	1	0,62	1
Gly	3,00	3	1,21	1
Ala	0,94	1	1,16	1
AetCys	0,96	1		0
Val		0		0
Met		0		0
Ile		0	0,87	1
Leu	0,82	1		0
Tyr	0,85	1	1,11	1
Phe		0		0
Lys	1,00	1	2,08	2
His		0		0
Arg		0		0
Trp		0		0

Im Peak d fanden sich ca. 40 nmol eines 11-Reste-Peptids, das durch Spaltung an AetCys 89 und AetCys 100 (vgl. Schema 2) entstanden sein mußte. Die bereits bekannte Aminosäuresequenz dieses Fragmentes zeigt, daß es eine zweifache positive Nettoladung tragen muß.

Der Gipfel e schließlich erwies sich als 25 nmol eines ebenfalls zwei positive Ladungen aufweisenden 11-Reste-Peptids, das den Pos. Gly 126 bis Lys 136 der B-Kette zuzuordnen war.

Das gesuchte 14-Reste-Peptid weist folgende Zusammensetzung auf: (Asx,Asx,Ala,Ala,Pro,His)-Lys-Val-Thr-Glu-Ser-Met-Leu-AetCys. Demzufolge kann die bei pH 4,5 maximal mögliche positive Ladung 2+, die minimal mögliche positive Ladung 0 betragen. Da wie eben beschrieben bei der Chromatographie des Gipfels V der Abb.25 an SP-Sephadex in Peak d und e zwei 11-Reste-Peptide mit jeweils zwei positiven Ladungen gefunden werden konnten, ist es wenig wahrscheinlich, daß das gesuchte 14-Reste-Peptid unter diesen Bedingungen nicht von der Säule eluiert worden sein sollte. Andererseits konnte das entsprechende 12-Reste-Peptid B-CB-I-T-5(AE), das durch das Fehlen des C-terminalen Aminoäthylcysteinrestes sogar eine positive Ladung weniger trägt, bei der Chromatographie unter denselben Bedingungen (vgl. Abb.23) an SP-Sephadex adsorbiert und eluiert werden, so daß es ebenfalls unwahrscheinlich ist, daß sich das gesuchte 14-Reste-Peptid in den nicht untersuchten Anfangsfraktionen der Abb. 29 befunden hatte.

Da es ebenfalls unwahrscheinlich sein dürfte, daß das 14-Reste-Peptid und das bislang ebenfalls nicht aufgefundene korrespondierende 34-Reste-Peptid gleichzeitig in dem einzigen bislang nicht identifizierten und/oder aufgetrennten Gipfel IV (Abb. 25) enthalten sind, liegt der Schluß nahe, daß bei dieser tryptischen Spaltung die Bindung an AetCys 75 weitgehend unangegriffen geblieben war.

BNPS-Skatolspaltungen

Parallel zu unseren Versuchen zur Reindarstellung sequenatorgerechter Kallikreinfragmente in möglichst guten Ausbeuten war der automatische Edmanabbau geeigneter Peptide im Labor von Prof. Tschesche im Gange. Während die bislang beschriebene aminoterminaler Teilsequenz der B-Kette mit Gln 33 endete (s. Schema 1), konnte in der Zwischenzeit am 61-Reste-Peptid B-CB-I-T-I (CM) die Sequenzaufklärung bis Gly 47 weitergeführt werden.

Dabei fand sich der einzige Tryptophanrest des 76-Reste-Peptids B-CB-I in der 35igsten Position dieses Bromcyanfragmentes, entsprechend der Position 46 der B-Kette (s. Schema 2). Somit war von einer Spaltung der Peptidkette an diesem einzigen Trp-Rest von B-CB-I, wie sie mit Hilfe von BNPS-Skatol (30) bzw. 1,3,5-Tribromcyclohexandion (31) zu erreichen sein sollte, eine Fragmentierung des 76-Reste-Peptids in nur zwei Bruchstücke zu erwarten. Dabei sollte das aminoterminaler Teilstück mit 35 Resten die bereits bekannte Aminosäuresequenz umfassen. Das C-terminaler Teilstück mußte von Gly 47 (Schema 2) bis Lys 82 die gesamte noch unaufgeklärte Aminosäuresequenz der B-Kette und somit des Kallikreins enthalten. Da mit Lys 82 bis Met 87 (vgl. Schema 2) sogar die sechs C-terminalen Aminosäuren des zu erwartenden 41-Reste-Peptids in ihrer Sequenz bekannt waren, sollte dieses in geradezu idealer Weise geeignet sein, den Abschluß der Sequenzaufklärung des Kallikreins zu ermöglichen.

Obwohl die Ausbeuten bei der Spaltung an Tryptophan, wie sie in der Literatur beschrieben werden, keineswegs 100% erreichen, war zu hoffen, daß sie nicht niedriger sein würden als die Gesamtausbeute der in bisherigen Versuchen beschriebenen Isolierung der tryptischen Peptide aus dem aminoäthylierten Bromcyanpeptid B-CB-I (AE). Zudem konnte als Ausgangsmaterial für die geplante Spaltung die carboxymethylierte Form des 76-Reste-Bromcyanpeptids Verwendung finden, die in wesentlich besserer Ausbeute als die aminoäthylierte Modifikation zugänglich ist.

B-CB-I-T-I

Um für die geplante Spaltung an Trp 35 zunächst möglichst klare Verhältnisse zu schaffen, gingen wir nicht vom 76-Reste-Peptid B-CB-I, sondern von dessen tryptischem 61 Aminosäuren umfassenden Teilstück B-CB-I-T-I aus (S.Schema 2). Statt eines aminoterminalen 35-Reste-Peptids war hierbei nach der BNPS-Skatol-Spaltung ein aminoterminal 20-Reste-Peptid zu erwarten, dessen Abtrennung von dem in gleicher Form anfallenden C-terminalen 41-Reste-Fragment einfacher durchzuführen sein sollte.

Für diesen Versuch wurden 0,25 μMol des 61-Reste-Peptids B-CB-I-T-I (CM) in 200 μl 50%iger Essigsäure (mit 0,12% Phenol) aufgenommen und 1,5 mg BNPS-Skatol, gelöst in 100 μl Eisessig, zugesetzt. Die Lösung wurde im Dunkeln 48 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend restliches Reagens durch Zugabe von 5 μl Mercaptoäthanol zerstört. Die darauf folgende Auftrennung des Reaktionsgemisches durch Gelfiltration über Sephadex G-50 lieferte drei Gipfel (Abb.30).

Sie wurden wie angezeigt vereinigt und jeweils entsprechende Proben zur quantitativen Aminosäureanalyse eingesetzt. Ihre Zusammensetzung ist in Tab.17 wiedergegeben. Beim Material des ersten Gipfels handelte es sich demzufolge um ca. 0,07 μMol noch ungespaltenen 61er Peptids. Im zweiten Gipfel fanden sich ca. 0,06 μMol des erwünschten C-terminalen 41-Reste-Peptids, bezeichnet als B-CB-I-S-1. Erwartungsgemäß enthielt der dritte Gipfel das korrespondierende aminoterminal 20-Reste-Peptid, bezeichnet als B-CB-I-T-I-S-2 in einer Menge von 0,06 μMol . Die Summe des Aminosäuregehalts beider Spaltprodukte entsprach dem 61 Aminosäurereste enthaltenden Ausgangsmaterial.

Als zusätzliche Bestätigung für die Richtigkeit der bisherigen Überlegungen zur Spaltung an Tryptophan 35 ist die Tatsache anzusehen, daß die Differenz des Aminosäuregehalts des 20-Reste-Peptids B-CB-I-T-I-S-2 und des 15-Reste-Peptids B-CB-I-T-4 (AE) genau den zu erwartenden fünf Aminosäureresten zwischen Cys 30

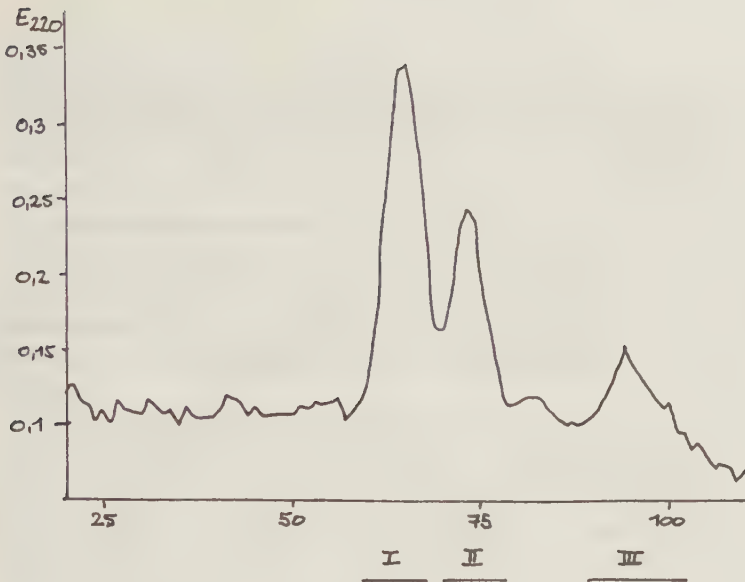


Abb.30 Auftrennung des BNPS-Skatol-Spaltgemisches von carboxymethyliertem 61-Reste-Peptid B-CB-I-T-I an Sephadex G-50 (190 x 2,0 cm) in 0,1 M NH_4HCO_3 -Lösung pH 7,0

Elutionsgeschwindigkeit 22,7 ml/h, Fraktionsgröße 3,79 ml,

und Trp 35 entspricht. Desgleichen weist erwartungsgemäß das 41-Reste-Peptid B-CB-I-S-1 einen um die gleichen fünf Aminosäurereste verminderten, aber ansonsten identischen Aminosäuregehalt wie das 46-Reste-Peptid B-CB-I-T-2(AE) auf.

Tab.17 Aminosäurezusammensetzung der Fragmente nach der BNPS-Skatolspaltung des carboxymethylierten 61-Reste-Peptids
B-CB-I-T-I
(Abb.30)

Aminosäuren	Peak I	B-CB-I-T-I Pos.27-87 d.B-Kette	Peak II	B-CB-I-S-1 Pos.47-87 d.B-Kette	Peak III	B-CB-I-T-I-S-2 Pos.27-46 d.B-Kette
CmCys	(1,32)	3	(0,94)	2	(0,25)	1
Asp	5,87	6	5,87	6	0,24	0
Thr	4,66	5	3,04	3	1,78	2
Ser	4,14	4	2,26	2	2,23	2
Hse	0,33	(1)	0,36	(1)		0
Glu	11,66	12	7,23	7	4,94	5
Pro	6,81	6	4,25	4	2,24	2
Gly	4,10	4	2,21	2	2,09	2
Ala	3,03	3	2,03	2	1,04	1
Val	2,79	3	1,85	2	0,88	1
Met		0		0		0
Ile	1,99	2	1,95	2		0
Leu	5,80	6	3,12	3	2,77	3
Tyr		0		0		0
Phe	2,93	3	2,94	3		0
His	1,08	1	1,04	1		0
Hsl	0,50	(1)	0,47	(1)		0
Lys	1,09	1	0,96	1		0
Arg		0		0		0
Trp		(1)		0		(1)
Summe		61		41		20

B-CB-I analytisch

Nachdem die Spaltung des 61-Reste-Peptids B-CB-I-T-I ein derart klares und mit den Erwartungen übereinstimmendes Resultat erbracht hatte, wurde im folgenden die BNPS-Skatol-Spaltung des 76-Reste-Bromcyanpeptids B-CB-I in Angriff genommen. Zur Gewinnung reinen Ausgangsmaterials wurde carboxymethyliertes B-CB-I unter den in Abb.5 angegebenen Bedingungen an SP-Sephadex chromatographiert, durch Gelfiltration über Sephadex G-25 fine in 50%iger Essigsäure entsalzt und das Produkt zur Trockne einrotiert.

Die derartig gewonnenen 0,45 μ Mol chromatographisch reines Peptid B-CB-I(CM) wurden in 400 μ l 50%iger Essigsäure gelöst und anschließend mit 3 mg BNPS-Skatol, gelöst in 200 μ l Eisessig, 60 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 10 μ l Mercaptoäthanol wurden Peptide und Reagentien durch Gelfiltration über Sephadex G-25 fine in 50%iger Essigsäure getrennt und der proteinhaltige Gipfel zur Trockne einrotiert. Das Ergebnis der anschließenden Gelfiltration des Peptidgemisches über Sephadex G-50 ist in Abb.31 wiedergegeben.

Die Aminosäureanalyse wies den ersten Gipfel dieses Eluates als ungespaltenes 76-Reste-Bromcyanpeptid und den zweiten Gipfel erwartungsgemäß als Material gleicher Aminosäurezusammensetzung, d.h. als Gemisch der entstandenen Spaltpeptide, aus.

Da somit wegen der sehr ähnlichen Molekülgröße bei der Gelfiltration keine Trennung zwischen dem 35-Reste- und dem 41-Reste-Peptid erreicht werden konnte, wurde die erforderliche Trennung bei der Peptide durch Ionenaustauschchromatographie in Angriff genommen. Zu diesem Zweck wurde die Hälfte des im zweiten Gipfel der Abb.31 enthaltenen Materials der Chromatographie an SP-Sephadex in schwach gepufferter 50%iger Essigsäure unterzogen. Dabei ergab sich eine Auftrennung in zwei Gipfel (Abb.32), deren Aminosäurezusammensetzung in Tab.18 wiedergegeben ist. Das Material

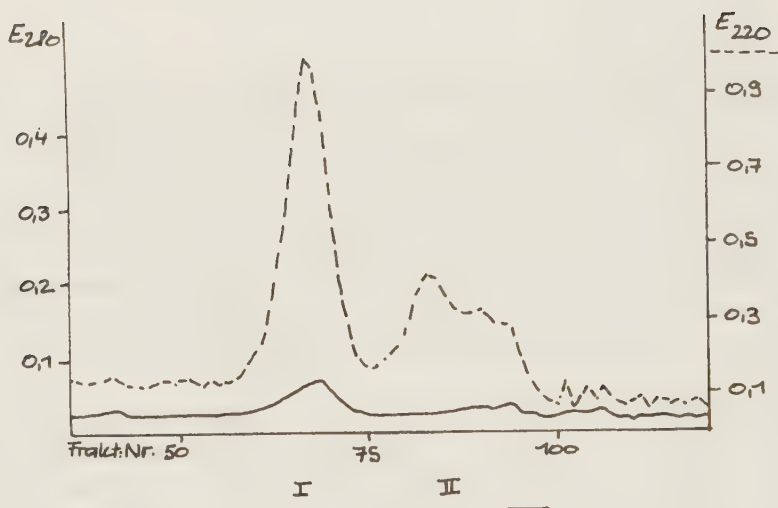


Abb.31 Auftrennung des BNPS-Skatol-Spaltgemisches von 0,45 μ Mol des carboxymethylierten 76-Reste-Bromcyanpeptids B-CB-I an Sephadex G-75 in 0,1 M NH_4HCO_3 pH 7,0
Elutionsgeschwindigkeit 9,5 ml/h,
Fraktionsgröße 2,36 ml,

des ersten Gipfels erwies sich hierbei als das erwartete C-terminale 41-Reste-Peptid B-CB-I-S-1 in guter Reinheit, entsprechend enthielt der zweite Gipfel das N-terminale 36-Reste-Peptid B-CB-I-S-2. Bezogen auf die eingesetzte Menge von 0,45 μ Mol des Ausgangsmaterials B-CB-I betrug die Ausbeute an chromatographisch reinem Tryptophanpeptid B-CB-I-S-1 und -2 jeweils ca. 25%.

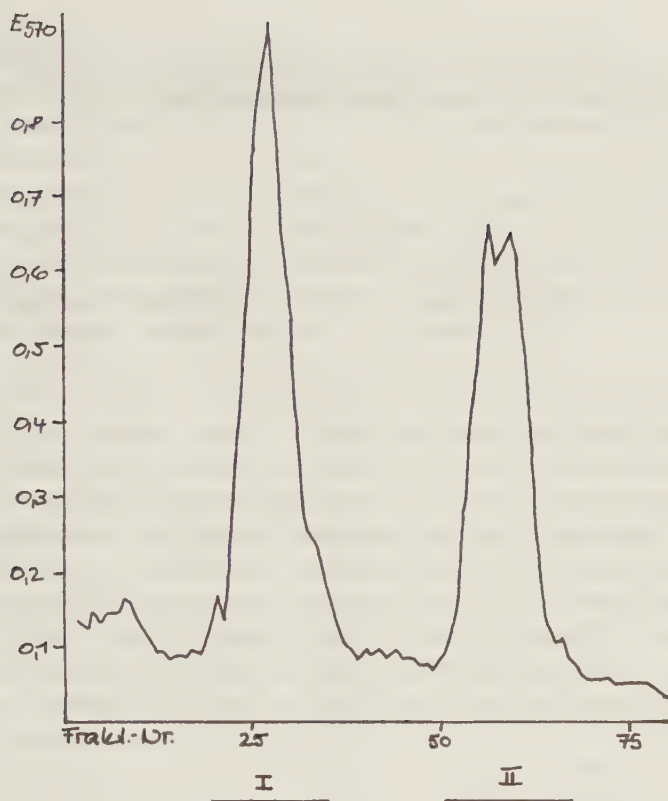


Abb.32 Chromatographie der Hälfte des Materials aus dem Gipfel II der Abb.31 an SP-Sephadex C-25 (35 x 0,8 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0 bis 0,3 M NaCl in HAC 50%, 0,05 M NaOH
Elutionsgeschwindigkeit 11,5 ml/h, Fraktionsgröße 1,44 ml,

Tab.18 Aminosäurezusammensetzung der Fragmente der BNPS-Skatol-Spaltung des 76-Reste-Bromcyanpeptids B-CB-I(CM) nach ihrer Auftrennung durch Chromatographie an SP-Sephadex C-25 (Abb.32)

Amino- säuren	Peak I	B-CB-I- S-1 Pos.47-87 d.B-Kette	Peak II	B-CB-I- S-2 Pos.12-46 d.B-Kette	B-CB-I Pos.12-87 d.B-Kette
CmCys	(1,16)	2	1)	1	3
Asp	5,90	6	1,42	1	7
Thr	3,95	3	2,86	3	6
Ser	2,25	2	3,35	3	5
Hse	0,62	(1)		0	(1)
Glu	7,25	7	6,55	6	13
Pro	3,94	4	2,91	3	7
Gly	2,16	2	2,42	2	4
Ala	2,04	2	3,06	3	5
Val	1,87	2	1,86	2	4
Met		0		0	0
Ile	1,90	2	1,06	1	3
Leu	3,02	3	5,87	6	9
Tyr		0		0	0
Phe	2,91	3		0	3
His	1,02	1		0	1
Hsl	0,41	(1)		0	(1)
Lys	1,00	1	1,95	2	3
Arg		0	0,95	1	1
Trp		0		(1)	1
Summe		41		35	76

1) nicht bestimmt

Um diese nicht ganz befriedigende Ausbeute möglichst zu erhöhen, wurde der erste Gipfel des entsprechend Abb.31 erhaltenen Materials unter identischen Bedingungen wie dort nochmals dem Angriff von BNPS-Skatol ausgesetzt und analog aufgearbeitet. Das Elutionsdiagramm der Peptidtrennung glich dabei zwar qualitativ jenem der Abb.31, jedoch ließen die entsprechenden Peakgrößen nur auf eine zusätzliche Spaltung von max. 5% schließen, so daß eine Wiederholung dieses aufwendigen Verfahrens für weitere Präparationen nicht sinnvoll erschien.

Da die Chromatographie der Tryptophanpeptide unter den oben verwendeten Bedingungen (Abb.32) einen zusätzlichen Entsalzungsschritt durch Gelfiltration erforderlich machte, wurde die zweite Hälfte des entsprechend der Abb.31, Peak II erhaltenen Peptidgemischs einer ähnlichen Ionenaustauschchromatographie, diesmal jedoch unter Verwendung des flüchtigen Triäthylamins anstelle von NaCl/NaOH, unterzogen. Das Ergebnis (Abb.33) entsprach in der Zusammensetzung beider Gipfel (Tab.19) sowie in der Ausbeute dem entsprechend Abb.32 erhaltenen Resultat, so daß bei weiteren Präparationen der Vorteil dieser einfacheren Methode genutzt werden konnte.

B-CB-I präparativ

Da die bislang in analytischem Maßstab durchgeführten Versuche zur Gewinnung von B-CB-I-S-1 befriedigend verlaufen waren, war es nun erforderlich, die für einen möglichst weitgehenden Edmanabbau benötigte Menge von ca. 0,5 μMol dieses Peptids präparativ zu isolieren.

Dazu wurden 127 mg Kallikrein (NKE-B-KZC 440) reduziert, carbomethyliert und die Ketten durch Gelfiltration an Sephadex G-75 in 0,1 M NH_4HCO_3 pH 7,0 aufgetrennt (Elutionsdiagramm analog Abb.1). Die anschließende Bromcyanspaltung der 2,8 μMol ge-

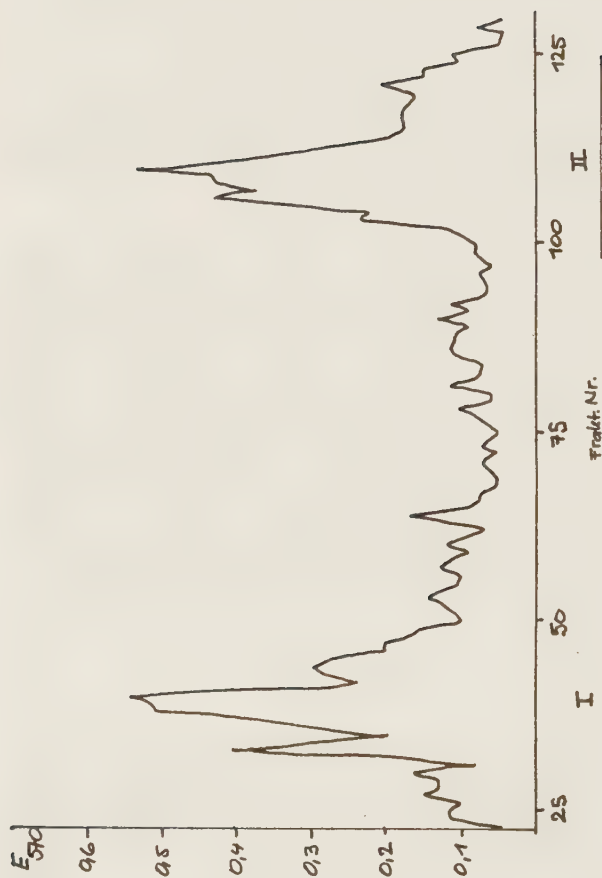


Abb. 33 Chromatographie der 2.Hälfte des Materials aus Gipfel II der Abb.31 an SP-Sephadex C-25 (35 x 0,8 cm) mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0,05 M bis 0,3 M Triäthylamin in 50%iger Essigsäure
Elutionsgeschwindigkeit 10,5 ml/h, Fraktionsgröße 1,32 ml, zur Ninhydrin-detection wurden 0,5 ml jeder Fraktion eingesetzt.

Tab.19 Aminosäurezusammensetzung der beiden Fraktionen der Abb.33

Amino- säuren	Peak I	B-CB- I-S-1	Peak II	B-CB- I-S-2	B-CB-I
CmCys	1)	2	1)	1	3
Asp	1)	6	1,43	1	7
Thr	2,99	3	3,01	3	6
Ser	2,18	2	3,55	3	5
Hse	0,77	(1)		0	(1)
Glu	6,84	7	6,86	6	13
Pro	3,99	4	3,14	3	7
Gly	2,28	2	3,06	2	4
Ala	2,11	2	3,43	3	5
Val	1,82	2	1,97	2	4
Met		0		0	0
Ile	1,87	2	1,06	1	3
Leu	2,92	3	5,98	6	9
Tyr		0		0	0
Phe	2,97	3		0	0
His	1,03	1	0,21	0	1
Lys	0,95	1	1,90	2	3
Arg	0,86	1		0	1

1) nicht bestimmt

wonnene B-Kette verlief wie bereits mehrfach beschrieben (vgl. Abb.4), so daß nach der Rechromatographie des 76-Reste-Bromcyanpeptids an SP-Sephadex (Bedingungen wie in Abb.5 angegeben) 2,08 μ Mol an chromatographisch reinem entsalzten B-CB-I(CM) für die weitere Spaltung zur Verfügung standen.

In Anlehnung an das bisherige Vorgehen wurde dieses Material in 2,0 ml 50%iger Essigsäure (mit 0,12% Phenol) gelöst, 15 mg BNPS-Skatol in 1,0 ml Eisessig zugefügt, die Lösung 40 h bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt und nach Zugabe von 15 μ l Mercaptoäthanol das Gemisch durch Gelfiltration über Sephadex G-25 in HAc 50% in Peptide und Reagentien getrennt. Das Elutionsdiagramm des anschließend zur Trockne rotierten und durch Gelfiltration über Sephadex G-50 aufgetrennten Peptidgemisches ist in Abb.34 dargestellt.

Dem dabei erhaltenen Elutionsdiagramm läßt sich unmittelbar die weitere Problematik ansehen. Es gleicht zwar qualitativ demjenigen der Abb.31, jedoch zeigt bereits eine Betrachtung des Verhältnisses der Peakgrößen untereinander, daß in Relation zu den - allerdings besser aufgetrennten - Spaltpeptiden B-CB-I-S-1 und -2 in Peak III und IV im Gipfel II sehr viel mehr ungespaltenes Ausgangsmaterial enthalten sein mußte.

Da die Spaltung durch BNPS-Skatol die carboxylseitige Peptidbindung des Tryptophans angreift, kennzeichnet das vollständige Fehlen der Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm das C-terminale der beiden Spaltprodukte und somit in diesem Fall das Peptid B-CB-I-S-1. Dieses war demzufolge im Gipfel III der Abb.34 zu vermuten, der daraufhin der Ionenaustauschchromatographie an SP-Sephadex unter den in Abb.33 angegebenen Bedingungen unterzogen wurde. Wie bereits nach dem Elutionsdiagramm der Gelfiltration (Abb.34) zu befürchten stand, konnten bei dieser Chromatographie jedoch statt der auf dieser Stufe bei den analytischen Vorversuchen erhaltenen Ausbeute von 25% entsprechend 0,5 μ Mol, nur 150

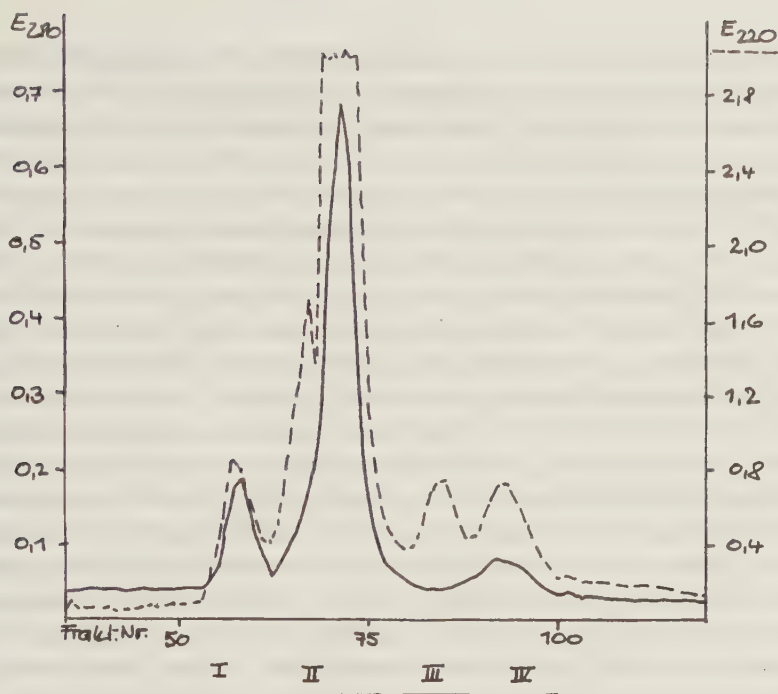


Abb.34 Gelfiltration des BNPS-Skatol-Spaltgemisches von 2,08 μ Mol B-CB-I(CM) an Sephadex G-50 (190 x 2,0 cm) in 0,1 M NH_4HCO_3 pH 7,5
Elutionsgeschwindigkeit 12,6 ml/h, Fraktionsgröße 3,16 ml

nmol des benötigten Peptids B-CB-I-S-1 isoliert werden. Bemühungen, die Ausbeute an B-CB-I-S-1 durch eine nochmalige Umsetzung des ungespaltenen Ausgangsmaterials mit BNPS-Skatol zu erhöhen, verliefen genauso unbefriedigend wie zuvor.

Um die Ausbeute an dem benötigten 41-Reste-Bromcyanpeptid möglicherweise doch noch zu verbessern, versuchten wir, nach der von Burstein und Patchornik angegebenen Methode (31) die Tryptophan-ylbindung in der bislang ungespalten verbliebenen Hauptmenge des Ausgangsmaterials mit TBC anzugreifen. Dazu wurde das lyophilisierte Produkt in 1,0 ml 80%iger Essigsäure aufgenommen und 17,2 mg (50 μ Mol) TBC, gelöst in 30 μ l Dioxan, zugesetzt. Nach 15 min Rühren bei Raumtemperatur wurden zur Beendigung der Reaktion 17 μ l Mercaptoäthanol zugefügt und die Lösung durch Gelfiltration über Sephadex G-25 entsalzt. Die anschließende Gelfiltration über Sephadex G-50 zeigte jedoch unmittelbar, daß die durchgeführte TBC-Behandlung keine weitere Fragmentierung mehr erbracht hatte. Vermutlich war der Tryptophanrest durch die zweimalige BNPS-Skatol Behandlung bereits modifiziert und somit durch TBC nicht mehr angreifbar geworden. Da das bisher verwendete BNPS-Skatol statt der in der Lit. (30) beschriebenen intensiven Gelbfärbung eine kräftige dunkelrote Farbe zeigte, lag es nahe, zu vermuten, daß eine inzwischen eingetretene Zersetzung dieses Reagens die stark verringerte Ausbeute des letzten Versuches verursacht hatte. Dankenswerterweise wurde uns von der Arbeitsgruppe Prof.Dr. Kühn am MPI für Biochemie eine ausreichende Menge von BNPS-Skatol zur Verfügung gestellt, das das in der Literatur beschriebene Aussehen hatte. Damit konnte eine weitere Versuchsreihe zur Isolierung von B-CB-I-S-1 in Angriff genommen werden.

Ausgehend von 144 mg NKE-B-KZC 599 erhielten wir nach Reduktion und Carboxymethylierung bei der Gelfiltration des Gemisches über Sephadex G-75 in NH_4HCO_3 keine Auftrennung von A- und B-Kette. Diese konnte erst durch Gelfiltration des lyophilisierten Materials über Sephadex G-75 in 50%iger Essigsäure erreicht werden. Bromcyanspaltung, Auftrennung des Gemisches, Rechromatographie von B-CB-I und Entsalzung des Produktes erfolgte wie bereits mehrfach beschrieben (vgl. Abb.4,5).

Für die Spaltung mit BNPS-Skatol konnten auf diese Weise 1,85 μMol chromatographisch reines 76-Reste-Bromcyanpeptid gewonnen werden. Dieses Material wurde in 2,0 ml 50%iger Essigsäure (mit 0,12% Phenol) gelöst, 15 mg BNPS-Skatol in 1,0 ml Eisessig zugesetzt und die Lösung 24 h bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt. Nach Zugabe von 20 μl Mercaptoäthanol wurden die Reagentien durch Gelfiltration über Sephadex G-25 entfernt. Die Auftrennung des zur Trockne einrotierten Materials bei der anschließenden Gelfiltration über Sephadex G-50 fine ist in Abb. 35 wiedergegeben. Bereits dieses Elutionsdiagramm ließ vermuten, daß diesmal eine wesentlich bessere Ausbeute als nach dem letzten Versuch erhalten worden war.

Zur weiteren Reinigung wurde das lyophilisierte Material aus dem zweiten Gipfel dieses Eluates wie bereits beschrieben (s. Abb.33) der Ionenaustauschchromatographie an SP-Sephadex unterzogen. Die Entsalzung des so erhaltenen Produktes durch Gelfiltration über Sephadex G-25 wurde anschließend gemeinsam mit einer geringen Menge früher gewonnenen gleichen Peptids durchgeführt. Die resultierende Menge von ca. 0,5 μMol B-CB-I-S-1 erwies sich bei der Bestimmung seiner Aminosäurezusammensetzung (Tab.20) als genügend rein, um mit Aussicht auf Erfolg für den Sequenatorabbau eingesetzt werden zu können.

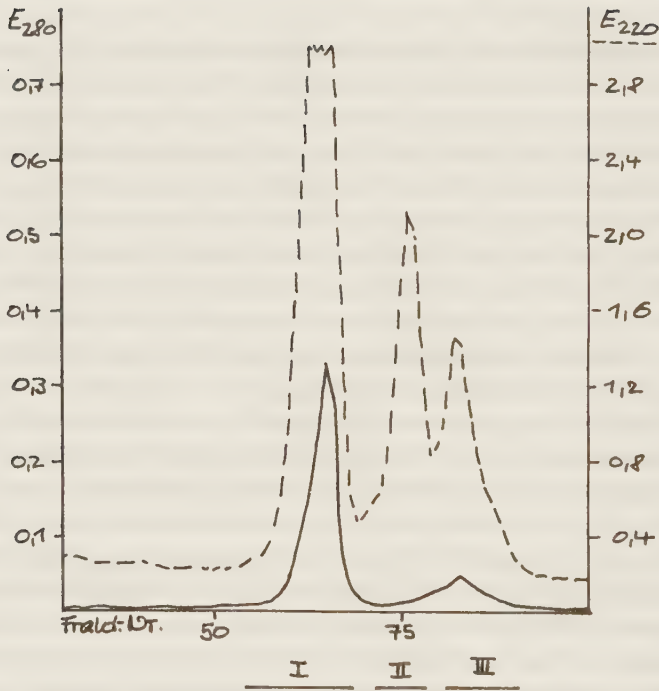


Abb.35 Gelfiltration des BNPS-Skatol-Spaltgemisches von 1,85 μ Mol des 76-Reste-Bromcyanpeptids B-CB-I(CM) an Sephadex G-50 (190 x 2,0 cm) in 0,1 M NH_4HCO_3 pH 7,5
Elutionsgeschwindigkeit 12,4 ml/h, FraktionsgröÙe 3,16 ml,

Tab.20 Aminosäurezusammensetzung des zur Sequenzanalyse eingesetzten 41-Reste-Peptids B-CB-I-S-1
(Mittelwert aus 3 Aminosäureanalysen)

Amino- säure		ganz- zählig
CmCys	(1,27)	2
Asp	5,87	6
Thr	2,95	3
Ser	2,16	2
Glu	7,28	7
Pro	3,92	4
Gly	2,22	2
Ala	2,07	2
Val	1,79	2
Hsl	0,91	1
Ile	2,36	2
Leu	3,04	3
Tyr		0
Phe	2,80	3
His	1,03	1
Lys	0,95	1
Arg		0
Summe		41

V. Sequenzierungsergebnisse

B-CB-I-T-I

Der automatische Edmanabbau lieferte die Sequenz von 21 aminoterminalen Aminosäuren des 61-Reste-Peptids B-CB-I-T-I(CM), das durch tryptische Spaltung von B-CB-I(CM) erhalten und wie früher beschrieben (28) isoliert und gereinigt worden war. Die so ermittelte Sequenz lautet: Val-Leu-Glu-Leu-Pro-Thr-Gln-Glu-Pro-Glu-Leu-Gly-Ser-Thr-Cys-Glu-Ala-Ser-Gly-Trp-Gly.

Die Einordnung in die Gesamtsequenz der B-Kette bereitete keinerlei Schwierigkeiten, da wie bereits erläutert schon die Charakterisierung des Peptids durch die spezifische stufenweise Darstellungsmethode ihm zweifelsfrei die Positionen 27 bis 87 der B-Kette zugewiesen hatte. Die Identität der Aminosäuresequenz von sieben aminoterminalen Resten dieses Peptids mit der an der intakten B-Kette ermittelten Sequenz Val 27 bis Gln 33 bestätigte die getroffene Zuordnung. Somit war vor der Sequenatoranalyse von B-CB-I-S-1 die Sequenz von 47 N-terminalen Resten der B-Kette geklärt (s. Schema 2)

B-CB-I-S-1

Da der durch BNPS-Skatol angegriffene einzige Tryptophanrest von B-CB-I die 46ste Position der B-Kette einnimmt (s. Schema 2), konnte die weitere Sequenzermittlung durch den automatischen Edmanabbau von B-CB-I-S-1 unmittelbar an der verbliebenen Lücke von 40 Aminosäuren einsetzen. Bei diesem Abbau ließ sich die Sequenz der 30 N-terminalen Reste des 41-Reste-Peptids B-CB-I-S-1

klären. Sie lautet: Gly-Ser-Ile-Glu-Pro-Gly-Pro-Asp-Asp-Phe-Glu-Phe-Pro-Asp-Glu-Ile-Gln-Cys-Val-Gln-Leu-Thr-Leu-Leu-Gln-Asn-Thr-Phe-Cys-Ala-(His?)

Da auch die Gewinnung dieses 41-Reste-Bruchstücks gezielt in einer Abfolge von Abbauschritten mit jeweils spezifischen Spaltmethoden an definierten Spaltstellen von chromatographisch gereinigten Zwischenprodukten erfolgt war, ergaben sich auch bei der Einordnung der so ermittelten Aminosäuresequenz der 30 N-terminalen Reste dieses Peptids in die Gesamtsequenz der B-Kette keine Probleme. So ließ sich das 41-Reste-Bruchstück B-CB-I-S-1, entstanden durch BNPS-Skatol-Spaltung am einzigen Tryptophanrest von B-CB-I, durch seine Aminosäurezusammensetzung, das Fehlen jeglicher Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm und den Hse/Hsl-Gehalt von 0,91 Resten leicht als das C-terminale der beiden entstandenen Fragmente charakterisieren, das demzufolge die Positionen Gly 47 bis Met 87 der B-Kette umfassen mußte (vgl. Schema).

Da die Sequenz der 6 C-terminalen Aminosäuren von B-CB-I-S-1 und somit von B-CB-I bereits auf anderem Wege geklärt worden war (s. o.), bleibt in der Primärstruktur der B-Kette und somit des Kallikreins noch eine einzige Lücke von 5 Aminosäureresten (His, 2Asx, Ala, Pro) in ihrer Sequenz zu klären. Dafür stehen anhand der bisherigen Untersuchungen einige Möglichkeiten zur Verfügung, ohne daß weitere Spaltmethoden zur Gewinnung neuer Peptide erforderlich sein dürften.

Zunächst sollte es technisch möglich sein, an einer nochmaligen Präparation von hochgereinigtem B-CB-I-S-1 den automatischen Edmanabbau noch um die benötigten fünf Stufen weiter voranzutreiben (hier 36 Abbaustufen erforderlich, bei der A-Kette konnten 40 Aminosäuren durchgehend sequenziert werden).

Andererseits bleibt die Möglichkeit, durch Fragmentierung der aminoäthylierten B-Kette wie oben ausführlich beschrieben, ge-

zielt das 12-Reste-Peptid B-CB-I-T-5(AE) bzw. das 14-Reste-Peptid B-T-II-T-2 zu isolieren. Diese beiden Peptide entstanden durch tryptische Spaltung an Cys 75 und decken mit ihren 6 aminoterminalen Resten die ungeklärte Region ab.

Obwohl die Ausbeute beider Peptide nicht sehr hoch war, dürfte zur Ermittlung einer derart kurzen Aminosäuresequenz, deren Einordnung in die Gesamtstruktur zudem bereits geklärt ist, eine verhältnismäßig geringe Materialmenge genügen.

61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
 Glu-Ile-Gln-Cys-Val-Gln-Leu-Thr-Leu-Leu-Gln-Asn-Thr-Phe-Cys-Ala(His,Ala,Asx,Pro,

— B-CB-I-S-1 —

— B-T-II —

81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99
 Asx) Lys-Val-Thr-Glu-Ser-Met-Leu-Cys-Ala-Gly-Tyr-Leu-Pro-Gly-Gly-Lys-Asp-Thr-
 — B-CB-IV-3 —

— B-CB-I-T-5 (AE) —

— B-T-II-T-2 —

100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118
 Cys-Met-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-Ile-Cys-Asn-Gly-Met-Trp-Gln-Gly-Ile-Thr-
 — B-CB-IV-2 —

119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137
 Ser-Trp-Gly-His-Pro-Thr-Cys-Gly-Ser-Ala-Asn-Lys-Pro-Ser-Ile-Tyr-Thr-Lys-Leu-
 — B-CB-II-T-2 —

138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152
 Ile-Phe-Tyr-Leu-Asp-Trp-Ile-Asn-Asn-Thr-Ile-Thr-Glu-Asn-Pro

— B-CB-II-T-1 —

VI. Homologiebeziehungen

Schema 3 zeigt den Versuch, die nun erstmals vollständig vorliegende Aminosäuresequenz des Kallikreins homolog zu den Sequenzen von Schweinetrypsin, Rindertrypsin, dem Trypsin des Katzenhais, den Chymotrypsinen A und B des Rindes sowie der Schweineelastase und dem Rinderthrombin einzuordnen (32). Die Bezifferung der Aminosäurepositionen folgt dabei jener des Chymotrypsinogens A (32).

Die Zuordnung der Reste 16 bis 127 und 175 bis 245 A wurde bereits früher ausführlich erläutert, so daß im Folgenden nur das neu ermittelte Teilstück von Glu 128 bis Asx 174 zu besprechen ist.

Mit Glu 128 ist die 34ste Aminosäure der B-Kette einer Position zuzuordnen, in der die Trypsine aller drei aufgeführten Spezies einen Cysteinrest enthalten. Während Kallikrein nur 10 Cysteinreste, d.h. maximal 5 Disulfidbrücken aufweist, enthält Trypsin 6 Disulfidbrücken. Cys 128 ist im Trypsin Teil der "C-terminalen Brücke", die Cys 128 und Cys 232 verbindet. Diese Disulfidbrücke fehlt dem Kallikrein ebenso wie den anderen aufgeführten Serinproteasen, so daß die Zuordnung eines Glutaminsäurerestes zu der Position 128 des Homologieschemas keine Probleme bietet, zumal da auch Chymotrypsin B in dieser Position die gleiche Aminosäure aufweist.

Als nächster Festpunkt für die Zuordnung bietet sich Cys 136 an, das in allen aufgeführten Proteinsequenzen (außer im Thrombin) zusammen mit Cys 201, das auch im Kallikrein auftritt, die "B-C-Ketten-Brücke" bildet (33). Diese Zuordnung der acht Aminosäurereste zwischen Glu 128 und Cys 136 wird durch Gly 133 bestärkt, das in allen Sequenzen mit Ausnahme der Elastase auftritt.

Kallikrein weist damit in dieser Region die gleiche Anzahl von Aminosäuren auf wie die Trypsine, während die Chymotrypsine und die Elastase mit der Position 131 einen, Thrombin mit den Positionen 131 und 131 A zwei zusätzliche Reste enthalten.

Die nächste sehr charakteristische Sequenz findet sich mit Ser-Gly-Trp-Gly bereits in den Positionen 139 bis 142, nur abgewandelt durch das Auftreten der dem Serin sehr ähnlichen Aminosäure Threonin in der Position 139 der Chymotrypsine, der Elastase und des Thrombins.

Während Thr 144 in allen Vergleichsequenzen konstant vorkommt, weist Kallikrein hier einen Isoleucinrest auf. Da das Kallikrein wie Trypsin in der Position 22 einen Cysteinrest trägt, der beim Trypsin mit Cys 157 die "N-terminale Brücke" bildet, muß Cys 64 der B-Kette des Kallikreins der Position Cys 157 des Trypsins homolog sein. Kallikrein weist jedoch zwischen Gly 142 und Cys 157 zwei Aminosäurereste mehr auf als Trypsin. Der Ort für eine Insertion dieser beiden Aminosäuren in das Homologieschema ist schwer auszumachen, da es sich um eine ziemlich variable Region handelt und nur Pro 152, das in Rinder- und Schweinetrypsin sowie in den Chymotrypsinen und im Thrombin vorkommt, einen Anhaltspunkt bietet. Zwei Aminosäurereste vor der strukturell bedeutsamen Disulfidbrücke, an der Cys 157 teilhat, weist Kallikrein einen Isoleucinrest auf, während alle verglichenen Sequenzen hier das ähnliche Leucin zeigen. Außer im Haitrypsin ist Glu 156 ebenfalls konstant, so daß dadurch die Zuordnung des Cysteinrestes 64 zur Position 157 des Homologieschemas bekräftigt wird.

Bis zum nächsten Festpunkt mit Cys 168 folgen nun 10 Aminosäuren, in denen sich Kallikrein teilweise mit den anderen Sequenzen deckt, teilweise auch unterscheidet. So weist Kallikrein wie Thrombin in der Position 158 einen Valinrest auf, während die Trypsine hier Leucin, die restlichen Sequenzen Alanin beinhalten. In der Position 160 zeigt sich Kallikrein mit Leucin

in Übereinstimmung mit allen anderen Sequenzen außer denjenigen der Trypsine, die hier Alanin aufweisen, während das in allen verglichenen Sequenzen konstante Pro 161 im Kallikrein durch Threonin ersetzt ist. Mit Leu 162-Leu 163 ähnelt die Kallikreinsequenz der Anordnung der unpolaren Aminosäuren Ile, Leu und Val in den entsprechenden Positionen der anderen Serinproteasen. Während Ser 164 der Trypsine und der Chymotrypsine im Kallikrein gegen einen Glutaminsäurerest ausgetauscht ist, befindet sich Asn 165 in Übereinstimmung mit den Chymotrypsinen und dem Rindertrypsin. Ebenfalls den Chymotrypsinen gleicht Kallikrein mit Thr 166, während Rinder- und Schweinetrypsin hier das ähnliche Serin enthält.

Cys 168, das in allen verglichenen Sequenzen enthalten ist, bildet bei sämtlichen dargestellten Serinproteasen zusammen mit Cys 182 den sog. "Methionin-Loop". Der folgende Alaninrest 169 ist dem Kallikrein eigentümlich. Außer der Elastase tragen alle verglichenen Enzyme an dieser Stelle einen basischen Lysin- oder Argininrest.

Zwar wurde His 170 bei der Sequenatoranalyse nicht absolut gesichert, jedoch konnte es in dieser Position wahrscheinlich gemacht werden. Da Alanin in der Position 171 bei allen Trypsinen konstant ist, wurde der einzige Alaninrest der noch nicht sequenzierten Lücke zwischen den Positionen 170 und 175 vorläufig dieser Stelle zugeordnet. Gleiches gilt für Pro 173, so daß für die beiden restlichen Asx-Reste nur die Positionen 172 und 174 verbleiben, obwohl die tatsächliche Aminosäuresequenz dieser fünf Reste selbstverständlich noch durch entsprechende Analysen zu klären ist.

Der in Schema 3 unternommene Vergleich der Primärstruktur des Kallikreins mit den Aminosäuresequenzen der Trypsinogene dreier verschiedener Spezies, der Chymotrypsinogene A und B des Rindes sowie der Schweineelastase und dem Rinderthrombin belegt eindeutig, daß dieses Enzym ein weiteres Mitglied der Familie der Se-

	<u>31</u>	<u>32</u>	<u>33</u>	<u>34</u>	<u>35</u>	<u>36</u>	<u>36A</u>	<u>36B</u>	<u>36C</u>	<u>37</u>	<u>38</u>	<u>39</u>	<u>40</u>	<u>41</u>	<u>41A</u>	<u>41B</u>	<u>41C</u>	<u>41D</u>
K (S)	Val-Ala-Ile-Tyr-----	-----His-Tyr-Ser-Ser-Phe-Gln-																
T (S)	Val-Ser-Leu-Asn-----	-----Ser-Gly-Ser-His-Phe-----																
T (R)	Val-Ser-Leu-Asn-----	-----Ser-Gly-Tyr-His-Phe-----																
T (H)	Val-Ser-Leu-Asn-----	-----Val-Gly-Tyr-His-Phe-----																
CA (R)	Val-Ser-Leu-Gln-Asp-Lys-----	-----Thr-Gly-Phe-His-Phe-----																
CB (R)	Val-Ser-Leu-Gln-Asp-Ser-----	-----Thr-Gly-Phe-His-Phe-----																
E (S)	Ile-Ser-Leu-Gln-Tyr-Arg-Ser-Gly-Ser-Ser-Trp-Ala-His-Thr-----	-----																
Th (R)	Val-Met-Leu-----Phe-Arg-Lys-----	-----Ser-Pro-Gln-Glu-Leu-Leu-----																

	<u>42</u>	<u>43</u>	<u>44</u>	<u>45</u>	<u>46</u>	<u>47</u>	<u>48</u>	<u>49</u>	<u>50</u>	<u>51</u>	<u>52</u>	<u>53</u>	<u>54</u>	<u>55</u>	<u>56</u>	<u>57</u>	<u>58</u>	<u>59</u>
K (S)	Cys-Gly-Gly-Val-Leu-Val-Asn-Pro-Lys-Trp-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Lys-																	
T (S)	Cys-Gly-Gly-Ser-Leu-Ile-Asn-Ser-Gln-Trp-Val-Val-Ser-Ala-Ala-His-Cys-Tyr-																	
T (R)	Cys-Gly-Gly-Ser-Leu-Ile-Asn-Ser-Gln-Trp-Val-Val-Ser-Ala-Ala-His-Cys-Tyr-																	
CA (R)	Cys-Gly-Gly-Ser-Leu-Ile-Asn-Glu-Asn-Trp-Val-Val-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Gly-																	
CB (R)	Cys-Gly-Gly-Ser-Leu-Ile-Ser-Glu-Asp-Trp-Val-Val-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Gly-																	
E (S)	Cys-Gly-Gly-Thr-Leu-Ile-Arg-Gln-Asn-Trp-Val-Met-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Val-																	
Th (R)	Cys-Gly-Ala-Ser-Leu-Ile-Ser-Asp-Arg-Trp-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Leu-																	

	60	61	62	63	64	65	65A	66	66A	66B	66C	66D	66E	66F	66G	66H	66I	66K
K (S)	Asn	Asp	Asn	Tyr	Glu	Val	Gly	Trp										
T (S)	Lys	Ser	Arg	Ile	Gln	Val	Arg	Leu										
T (R)	Lys	Ser	Gly	Ile	Gln	Val	Arg	Leu										
T (H)	Gln	Arg	Arg	Ile	Gln	Val	Arg	Leu										
CA (R)	Val	Thr	Thr	Ser	Asp	Val		Val										
CB (R)	Val	Thr	Thr	Ser	Asp	Val		Val										
E (S)	Asp	Arg	Glu	Leu	Thr	Phe	Arg	Val										
Th (R)	Leu	Tyr	Pro	(Trp,	Pro,	Asx,	Lys,	Asx,	Phe)	Thr	Val	Asx	Asx	Leu	Leu	(Ser,	Val,	Val,

	66L	66M	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82
K (S)																		
T (S)																		
T (R)																		
T (H)																		
CA (R)																		
CB (R)																		
E (S)																		
Th (R)																		

-----Leu-Arg-His-Asn-Leu-Phe-Phe-Glu-Asn-Glu-Asn-Thr-Ala-Gln-Phe-
 -----Gly-Glu-His-Asn-Ile-Asp-Val-Leu-Glu-Gly-Asn-Glu-Gln-Phe-
 -----Gly-Gln-Asp-Asn-Ile-Asn-Val-Val-Glu-Gly-Asn-Gln-Gln-Phe-
 -----Gly-Glu-His-Asp-Ile-Ser-Ala-Asn-Glu-Gly-Asp-Glu-Thr-Tyr-
 -----Val-Ala-Gly-Glu-Phe-Asp-Gln-Gly-Ser-Ser-Ser-Glu-Lys-Ile-Gln-Lys-
 -----Val-Ala-Gly-Glu-Phe-Asp-Gln-Gly-Leu-Glu-Thr-Glu-Asp-Thr-Gln-Val-
 -----Val-Val-Gly-Glu-His-Asn-Leu-Asn-Gln-Asn-Gly-Thr-Glu-Gln-Tyr-
 Glx,Trp)Arg,Ile-Gly-Lys-His-Ser-Arg-Thr-Arg-Tyr-Glu-Arg-Lys-Val-Glu-Lys-

83 84 84A 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 95A 95B 95Y 95Z
 Phe-Gly-----Val-Thr-Ala-Asp-Phe-Pro-His-Pro-Gly-Phe-Asn-Leu-Ser/Ala-Asp-
 Ile-Asn-----Ala-Ala-Lys-Ile-Ile-Thr-His-Pro-Asn-Phe-Asn-----
 Ile-Ser-----Ala-Ser-Lys-Ser-Ile-Val-His-Pro-Ser-Tyr-Asn-----
 Ile-Asp-----Ser-Ser-Met-Val-Ile-Arg-His-Pro-Asn-Tyr-Ser-----
 Leu-Lys-----Ile-Ala-Lys-Val-Phe-Lys-Asn-Ser-Lys-Tyr-Asn-----
 Leu-Lys-----Ile-Gly-Lys-Val-Phe-Lys-Asn-Pro-Lys-Phe-Ser-----
 Val-Gly-----Val-Gln-Lys-Ile-Val-Val-His-Pro-Tyr-Trp-Asn-----
 Ile-Ser-Met-Leu-Asp-Lys-Ile-Tyr-Ile-His-Pro-Arg-Tyr-Asn-----

K (S)
 T (S)
 T (R)
 T (H)
 CA (R)
 CB (R)
 E (S)
 Th (R)

96 97 98 99 99A 99B 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111
 Gly-Lys-Asp-Tyr-----Ser-His-Asp-Leu-Met-Leu-Leu-Arg-Leu-Gln-Ser-Pro-
 Gly-Asn-Thr-Leu-----Asp-Asn-Asp-Ile-Met-Leu-Ile-Lys-Leu-Ser-Ser-Pro-
 Ser-Asn-Thr-Leu-----Asn-Asn-Asp-Ile-Met-Leu-Ile-Lys-Leu-Lys-Ser-Ala-
 Gly-Tyr-Asp-Leu-----Asp-Asn-Asp-Ile-Met-Leu-Ile-Lys-Leu-Ser-Lys-Pro-
 Ser-Leu-Thr-Ile-----Asn-Asn-Asp-Ile-Thr-Leu-Leu-Lys-Leu-Ser-Thr-Ala-
 Ile-Leu-Thr-Val-----Arg-Asn-Asp-Ile-Thr-Leu-Leu-Lys-Leu-Ala-Thr-Pro-
 Thr-Asp-Asp-Val-Ala-Ala-Gly-Tyr-Asp-Ile-Ala-Leu-Leu-Arg-Leu-Ala-Gln-Ser-
 Trp-Lys-Glu-----Asn-Leu-Asp-Arg-Asp-Ile-Ala-Leu-Leu-Lys-Leu-Lys-Arg-Pro-

K (S)
 T (S)
 T (R)
 T (H)
 CA (R)
 CB (R)
 E (S)
 Th (R)

112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129
 K (S) Ala-Lys-Ile-Thr-Asp-Ala-Val-Lys-Val-Leu-Glu-Leu-Pro-Thr-----Gln-Glu-Pro-
 T (S) Ala-Thr-Leu-Asn-Ser-Arg-Val-Ala-Thr-Val-Ser-Leu-Pro-Arg-----Ser-Cys-Ala-
 T (R) Ala-Ser-Leu-Asn-Ser-Arg-Val-Ala-Ser-Ile-Ser-Leu-Pro-Thr-----Ser-Cys-Ala-
 T (H) Ala-Ala-Leu-Asn-Arg-Asn-Val-Asp-Leu-Ile-Ser-Leu-Pro-Thr-----Gly-Cys-Ala-
 CA (R) Ala-Ser-Phe-Ser-Gln-Thr-Val-Ser-Ala-Val-Cys-Leu-Pro-Ser-Ala-Ser-Asp-Asp-
 CB (R) Ala-Gln-Phe-Ser-Glu-Thr-Val-Ser-Ala-Val-Cys-Leu-Pro-Ser-Ala-Asp-Glu-Asp-
 E (S) Val-Thr-Leu-Asn-Ser-Tyr-Val-Gln-Leu-Gly-Val-Leu-Pro-Arg-Ala-Ser-Thr-Ile-
 Th (R) Ile-Glu-Leu-Ser-Asp-Tyr-Ile-His-Pro-Val-Cys-Leu-Pro-Lys,Ala-Ser-Thr-Arg,

130 131 A 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 A 144 145
 K (S) Glu-----Leu-Gly-Ser-Thr-Cys-Glu-Ala-Ser-Gly-Trp-Gly-Ser-----Ile-Glu-
 T (S) Ala-----Ala-Gly-Thr-Glu-Cys-Leu-Ile-Ser-Gly-Trp-Gly-Asn-----Thr-Lys-
 T (R) Ser-----Ala-Gly-Thr-Gln-Cys-Leu-Ile-Ser-Gly-Trp-Gly-Asn-----Thr-Lys-
 T (H) Tyr-----Ala-Gly-Glu-Met-Cys-Leu-Ile-Ser-Gly-Trp-Gly-Asn-----Thr-Met-
 CA (R) Phe-Ala-----Ala-Gly-Thr-Thr-Cys-Val-Thr-Thr-Gly-Trp-Gly-Leu-----Thr-Arg-
 CB (R) Phe-Pro-----Ala-Gly-Met-Leu-Cys-Ala-Thr-Thr-Gly-Trp-Gly-Lys-----Thr-Lys-
 E (S) Leu-Ala-----Asn-Asn-Ser-Pro-Cys-Tyr-Ile-Thr-Gly-Trp-Gly-Leu-----Thr-Arg-
 Th (R) Leu-Leu-His-Ala-Gly-Phe-Lys-Gly-Arg-Val-Thr-Gly-Trp-Gly-Asn-Arg-Thr-Thr-

145A B 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161
 K (S) Pro-Gly-Pro-Asp-Phe-Glu-Phe-Pro-Asp-Glu-Ile-Gln-Cys-Val-Gln-Leu-Thr-
 T (S) -----Ser-Ser-Gly-Ser-Ser-Tyr-Pro-Ser-Leu-Leu-Gln-Cys-Leu-Lys-Ala-Pro-
 T (R) -----Ser-Ser-Gly-Thr-Ser-Tyr-Pro-Asp-Val-Leu-Lys-Cys-Leu-Lys-Ala-Pro-
 T (H) -----Asp-Gly-Ala-Val-Ser-----Gly-Asp-Gln-Leu-Gln-Cys-Leu-Asp-Ala-Pro-
 CA (R) -----Tyr-Thr-Asn-Ala-Asn-Thr-Pro-Asp-Arg-Leu-Gln-Gln-Ala-Ser-Leu-Pro-
 CB (R) -----Tyr-Asn-Ala-Leu-Lys-Thr-Pro-Asp-Lys-Leu-Gln-Gln-Ala-Thr-Leu-Pro-
 E (S) -----Thr-Asn-Gly-Gln-Leu-Ala-Gln-Thr-Leu-Gln-Gln-Ala-Tyr-Leu-Pro-
 Th (R) -----Ser-Val-Ala-Glu-Val-Gln-Pro-Ser-Val-Leu,Gln-Val-Val-Asn-Leu-Pro-

162 163 164 165 166 167 168 169 170 A B 171 172 173 174 175 176 177
 K (S) Leu-Leu-Gln-Asn-Thr-Phe-Cys-Ala (His, Ala,Asx,Pro,Asx) Lys-Val-Thr-
 T (S) Val-Leu-Ser-Asp-Ser-Ser-Cys-Lys-Ser-----Ala-Tyr-Pro-Gly-Gln-Ile-Thr-
 T (R) Ile-Leu-Ser-Asn-Ser-Ser-Cys-Lys-Ser-----Ala-Tyr-Pro-Gly-Gln-Ile-Thr-
 T (H) Val-Leu-Ser-Asp-Ala-Glu-Cys-Lys-Gly-----Ala-Tyr-Pro-Gly-Met-Ile-Thr-
 CA (R) Leu-Leu-Ser-Asn-Thr-Asn-Cys-Lys-Lys-----Tyr-Trp-Gly-Thr-Lys-Ile-Lys-
 CB (R) Ile-Val-Ser-Asn-Thr-Asp-Cys-Arg-Lys-----Tyr-Trp-Gly-Ser-Arg-Val-Thr-
 E (S) Thr-Val-Asp-Tyr-Ala-Ile-Cys-Ser-Ser-Ser-Tyr-Trp-Gly-Ser-Thr-Val-Lys-
 Th (R) Leu-Val-Glu-Arg-Pro-Val-Cys-Lys-Ala-Ser-Thr-Arg-----Arg-Ile-Arg-Ile-Thr-

	178	179	180	181	182	183	184	A	B	C	185	186	187	188	A	B	189	190
K (S)																		
T (S)																		
T (R)																		
T (H)																		
CA (R)																		
CB (R)																		
E (S)																		
Th (R)																		

Glu-Ser-Met-Leu-Cys-Ala-Gly-Tyr-----Leu-Pro-Gly-Gly-Lys-----Asp-Thr-
 Gly-Asn-Met-Ile-Cys-Val-Gly-Phe-----Leu-Glu-Gly-Gly-Lys-----Asp-Ser-
 Ser-Asn-Met-Phe-Cys-Ala-Gly-Tyr-----Leu-Glu-Gly-Gly-Lys-----Asp-Ser-
 Asn-Asn-Met-Met-Cys-Val-Gly-Tyr-----Met-Glu-Gly-Gly-Lys-----Asp-Ser-
 Asp-Ala-Met-Ile-Cys-Ala-Gly-----Ala-Ser-Gly-Val-----Ser-Ser-
 Asp-Val-Met-Ile-Cys-Ala-Gly-----Ala-Ser-Gly-Val-----Ser-Ser-
 Asn-Ser-Met-Val-Cys-Ala-Gly-----Gly-Asn-Gly-Val-Arg-----Ser-Gly-
 Asx-Asx-Met-Phe-Cys-Ala-Gly-Tyr-Lys-Pro-GlyGlu-Gly-Lys-Arg-Gly-Asp-Ala-

	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	A	B	205	206
K (S)																		
T (S)																		
T (R)																		
T (H)																		
CA (R)																		
CB (R)																		
E (S)																		
Th (R)																		

Cys-Met-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-Ile-Cys-Asn-Gly-Met-----
 Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Val-Val-Cys-Asn-Gly-Gln-----
 Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Val-Val-Cys-Ser-Gly-Lys-----
 Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Val-Val-Cys-Asn-Gly-Met-----
 Cys-Met-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-Val-Cys-Lys-Lys-Asn-----Gly-Ala-
 Cys-Met-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-Val-Cys-Gln-Lys-Asn-----Gly-Ala-
 Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-His-Cys-Leu-Val-Asn-----Gly-Gln-
 Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-Val-Met-Lys-Ser-Pro-Tyr-Asn-Asn-Arg-

207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 A 218 219 220 221 A 222
 K (S) -----Trp-Gln-Gly-Ile-Thr-Ser-Trp-Gly-His-----Pro-Thr-Cys-Gly-Ser-Ala-
 T (S) -----Leu-Gln-Gly-Ile-Val-Ser-Trp-Gly-Tyr-----Gly-Cys-Ala-Gln-Lys-
 T (R) -----Leu-Gln-Gly-Ile-Val-Ser-Trp-Gly-Tyr-----Gly-Cys-Ala-Gln-Lys-
 T (H) -----Leu-Gln-Gly-Ile-Val-Ser-Trp-Gly-Tyr-----Gly-Cys-Ala-Glu-Arg-
 CA (R) Trp-Thr-Leu-Val-Gly-Ile-Val-Ser-Trp-Gly-Ser-----Ser-Thr-Cys-Ser-----Thr-
 CB (R) Trp-Thr-Leu-Ala-Gly-Ile-Val-Ser-Trp-Gly-Ser-----Ser-Thr-Cys-Ser-----Thr-
 E (S) Tyr-Ala-Val-His-Gly-Val-Val-Ser-Phe-Val-Ser-Arg-Leu-Gly-Cys-Asn-Val-Thr-
 Th (R) Trp-Tyr-Gln-Met-Gly-Ile-Val-Ser-Trp-Gly-Glu-----Gly-Cys-Asp-Arg-Asn-

223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240
 K (S) Asn-Lys-Pro-Ser-Ile-Tyr-Thr-Lys-Leu-Ile-Phe-Tyr-Leu-Asp-Trp-Ile (Asn,Asn)
 T (S) Asn-Lys-Pro-Gly-Val-Tyr-Thr-Lys-Val-Cys-Asn-Tyr-Val-Asn-Trp-Ile-Gln-Gln-
 T (R) Asn-Lys-Pro-Gly-Val-Tyr-Thr-Lys-Val-Cys-Asn-Tyr-Val-Ser-Trp-Ile-Lys-Gln-
 T (H) Asp-His-Pro-Gly-Val-Tyr-Thr-Arg-Val-Cys-His-Tyr-Val-Ser-Trp-Ile-His-Glu-
 CA (R) Ser-Thr-Pro-Gly-Val-Tyr-Ala-Arg-Val-Thr-Ala-Leu-Val-Asn-Trp-Val-Gln-Gln-
 CB (R) Ser-Thr-Pro-Ala-Val-Tyr-Ala-Arg-Val-Thr-Ala-Leu-Met-Pro-Trp-Val-Gln-Glu-
 E (S) Arg-Lys-Pro-Thr-Val-Phe-Thr-Arg-Val-Ser-Ala-Tyr-Ile-Ser-Trp-Ile-Asn-Asn-
 Th (R) Gly-Lys-Tyr-Gly-Phe-Tyr-Thr-His-Val-Phe-Arg-Lys-Leu-Lys-Trp-Ile-Gln-Lys-

K (S)	241	242	243	244	245	A	B
	Thr-Ile-Thr-Glu-Asn-Pro						
T (S)							
	Thr-Ile-Ala-Ala-Asn						
T (R)							
	Thr-Ile-Ala-Ser-Asn						
T (H)							
	Thr-Ile-Ala-Ser-Val						
CA (R)							
	Thr-Leu-Ala-Ala-Asn						
CB (R)							
	Thr-Leu-Ala-Ala-Asn						
E (S)							
	Val-Ile-Ala-Ser-Asn						
Th (R)							
	Val-Ile-Asp-Arg-Leu-Gly-Ser						

rinproteasen des Pankreas darstellt. Die prozentuale Angabe identischer Aminosäuren in homologen Positionen mag eine grobe Abschätzung des jeweiligen Verwandtschaftsgrades erlauben.

34 der insgesamt verglichenen 232 Positionen (15%) sind bei allen verglichenen Enzymen identisch. Tab.21 faßt das Ausmaß der nach Schema 3 festgelegten Homologiebeziehungen zwischen dem Kallikrein und den anderen dargestellten Aminosäuresequenzen zusammen. Wie zu erwarten, wurden demgemäß Aminosäuren in Positionen an der Oberfläche des Moleküls wesentlich häufiger ausgetauscht, als solche im Inneren des Enzyms.

Tab.21 Homologiebeziehungen zwischen der Aminosäuresequenz des Kallikreins und den Sequenzen der anderen in Schema 3 aufgeführten Serinproteasen

Enzyme	alle Reste %	innere Reste %	äußere Reste %
Trypsin (Schwein)	41	60	30
Trypsin (Rind)	39	59	26
Trypsin (Hai)	37	60	25
Chymotrypsin A (Rind)	33	57	20
Chymotrypsin B (Rind)	32	58	18
Elastase (Schwein)	33	53	22
Thrombin (Rind)	21	52	18

Tab.21 zeigt, daß die Homologie des Kallikreins zum Trypsin deutlich ausgeprägter ist als zu den anderen Enzymen. Daß es sich dabei nicht um eine spezifisch bei den Pankreasproteasen der Spezies Schwein vorhandenen Ähnlichkeit von Kallikrein und Trypsin

handelt, beweist der Vergleich mit Rinder- und Haitrypsinen. Das Kallikrein des Schweines zeigt sogar zum Trypsin des Haies, dessen Entwicklungslinie sich vor ca. 400 Millionen Jahren von der Linie abgetrennt hat, die zu den Säugetieren führte (35), eine nähere Verwandtschaft als zur Elastase aus dem Pankreas der gleichen Spezies.

Während Kallikrein und Trypsin des Schweines 41% aller Aminosäurereste gemeinsam haben, beläuft sich die Identität zwischen Rinder- und Schweinetrypsin auf 82%, diejenige zwischen Rinder- und Haitrypsin immerhin noch auf 65%.

Somit ähnelt Kallikrein zwar der Enzymfamilie der Trypsine etwas mehr als den anderen Serinproteasen, keinesfalls jedoch kann es als eine Art von "katalytisch spezifischerem Trypsin" betrachtet werden.

Der Homologiegrad zwischen Kallikrein und den restlichen Serinproteasen des Pankreas, den Chymotrypsinen A und B sowie der Elastase ist vergleichbar groß, während die Ähnlichkeit mit der B-Kette des in der Leber synthetisierten Thrombins deutlich geringer ist.

Die ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit der Serinproteasen des Pankreas sowie des Thrombins läßt auf die gemeinsame Herkunft aus einem sehr alten Gen mit trypsinähnlicher Spezifität schließen (36). Entsprechend dem Grad der Homologiebeziehungen dürfte sich daraus im Verlaufe der Evolution zunächst das Leberenzym Thrombin und erst später die Linien der Chymotrypsine und der Elastase abgetrennt haben. Die deutlich engeren Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Trypsin und dem Kallikrein weisen darauf hin, daß die Entwicklungslinie der Kallikreine später als jene der Chymotrypsine und der Elastase von der Trypsinlinie abzweigte.

Die engere Verwandtschaft zwischen Kallikrein und Trypsin wird neben dem allgemeinen Homologiegrad auch durch die sehr ähnli-

che Primärspezifität beider Enzyme belegt, die durch den beiden gemeinsamen Aminosäurerest Asparaginsäure 189 bedingt wird.

Auf eine ausgeprägte strukturelle Ähnlichkeit zwischen dem Kallikrein und Trypsin weisen auch die Positionen der Cysteinreste hin. Während das Trypsinmolekül entsprechend den 12 Cysteinresten 6 Disulfidbrücken beinhaltet, zeigt Kallikrein alle 10 Cysteinreste in homologen Positionen zu Cysteinresten des Trypsins, so daß die Annahme von entsprechend homologen 5 Disulfidbrücken gerechtfertigt erscheint. Einzig die "C-terminale Brücke" (Cys 128-Cys 232) des Trypsins fehlt im Kallikrein. Hingegen tritt die "N-terminale Brücke" (Cys 22-Cys157), die Kallikrein und Trypsin gemeinsam hat, in keiner anderen Serinprotease auf. Um das Auftreten einer freien Sulfhydrylgruppe und damit eine starke Veränderung der Reaktivität zu vermeiden, muß das Verschwinden einer Disulfidbrücke im Verlaufe der Evolution durch eine gleichzeitige gekoppelte Mutation zweier Genloci bedingt sein. Dieses Ereignis ist somit sehr viel unwahrscheinlicher als die Mutation zweier unabhängiger Genorte. Das Auftreten einer Disulfidbrücke, die nur Kallikrein und Trypsin gemeinsam ist, darf somit als weiterer schwerwiegender Hinweis für die besondere Verwandtschaft beider Enzyme gewertet werden.

Die bisher bekannten dreidimensionalen Strukturen von Trypsin (27), Chymotrypsin (38) und der Elastase (39) demonstrieren deutlich, daß die Tertiärstruktur einer Gruppe homologer Enzyme im Verlauf der divergierenden Entwicklung getreuer konserviert wird als die Primärstruktur. Auf Grund des hohen Homologiegrades dürfte demzufolge die Raumstruktur des Kallikreins jenen der anderen Serinproteasen ebenfalls stark gleichen. In Analogie zum Trypsinmodell konnten bereits in unseren früheren Untersuchungen einige wesentliche Züge der Reaktivität des Kallikreins diskutiert werden, da die dafür notwendigen Amino-

säurereste in den bereits früher sequenzierten Bezirken liegen (28).

So dürfte beispielsweise die Aktivierung des Enzyms durch limitierte Proteolyse in ähnlicher Weise wie sie am Chymotrypsinmolekül (40) beschrieben ist, ablaufen. Der Ionenpaarbildung aus Ile 16 und Asp 194 dürfte für die Konfiguration des aktiven Zentrums des Enzyms eine entsprechende Bedeutung zukommen.

Der Vergleich der Raumstrukturen von Trypsinogen und Trypsin ermöglichte R. Huber und W. Bode (41) die Feststellung, daß nach der Aktivierung des Enzyms 85% der Aminosäurereste in unveränderten Positionen verbleiben. Nur 4 Regionen des Moleküls, von den Autoren als "activation domains" bezeichnet, verändern ihre Konfiguration im Verlaufe der Enzymaktivierung deutlich. Dabei handelt es sich um die Segmente N-Terminus bis Gly 19, Gly 142 bis Pro 152, Gly 184 A bis Gly 193 und Gly 216 bis Asn 223.

Dem kleinen Glycinrest dürfte dabei besondere Bedeutung für die Flexibilität der Polypeptidkette zukommen, so daß die Konservierung dieser Positionen im Verlauf der Evolution bedeutsam für den Aktivierungsmechanismus der Serinproteasen sein dürfte. Da Kallikrein in homologen Positionen die gleichen Aminosäurereste aufweist, dürfte dieses Enzym bei seiner Aktivierung ähnliche Konformationsänderungen durchlaufen wie sie am Beispiel des Trypsins beschrieben sind.

Das "charge-relay-system" (His 57, Asp 102, Ser 195), das den gemeinsamen katalytischen Wirkungsmechanismus aller Serinproteasen des Pankreas sowie des Thrombins bewirkt, konnte ebenso wie die Wechselwirkung des Kallikreins mit einigen Inhibitoren anhand der analogen Raumstrukturen anderer Serinproteasen bereits in früheren Untersuchungen diskutiert werden (28).

Im Folgenden soll der Versuch gemacht werden, strukturelle Elemente, die ausschließlich dem Kallikrein zukommen, mit der spe-

zifischen Reaktivität dieses Enzyms in Beziehung zu setzen. Ca^{++} -Ionen, die beim Trypsin, gebunden an Glu 70 und Glu 80 (42), die katalytische Aktivität fördern, bleiben beim Kallikrein, in Übereinstimmung mit dem Vorkommen von Arginin und Alanin in den entsprechenden Positionen, wirkungslos.

Im Bereich der Spaltstelle zwischen A- und B-Kette des Kallikreins findet sich bei allen Serinproteasen eine Region von ziemlicher Variabilität. Der letzte sichere Ankerpunkt in der A-Kette ist Asn 95, der nächste Fixpunkt in der B-Kette ist Asp 102. Während Trypsin und Chymotrypsin in diesem Segment 6 Aminosäurereste aufweisen, hat das Kallikrein hier mindestens 4 Positionen mehr. Dieser wohl nach außen gerichtete "Kallikreinloop" könnte für den Angriff proteolytischer Enzyme im Verlaufe der Kallikreinaktivierung geeignete Bedingungen bieten. Die Spaltstelle zwischen der A- und der B-Kette des Kallikreins, die bei keiner anderen Serinprotease in homologer Position auftritt, könnte hiermit ihre Erklärung finden.

Da weder Serin noch Alanin wahrscheinliche Spaltstellen für Endopeptidasen des Pankreas darstellen, bleibt die Natur des angreifenden Enzyms zunächst unklar. Jedoch weist schon das Auftreten eines halben Serinrestes als C-Terminus der A-Kette auf den der initialen Spaltung folgenden Angriff durch Carboxypeptidasen hin. Untersuchungen am Kallikrein aus der Submaxillarisdrüse des Schweines deuten darauf, daß möglicherweise sogar drei Aminosäurereste, darunter ein als Initialspaltstelle charakteristischer Lysinrest, durch nachfolgenden proteolytischen Angriff abgebaut worden sein könnte (43).

Der ausgedehnte "Kallikreinloop" weist noch andere interessante Züge auf. Die Kohlehydratseitenkette der A-Kette dürfte, wie bereits früher erläutert, an den Asparaginrest 95 gebunden sein

(28). Die unmittelbar benachbarten Aminosäurereste in den Positionen 96 bis 99 treten nach Röntgenstrukturanalysen mit Bezirken von Sojabohnen sowie Pankreastrypsininhibitor in Kontakt (44,45). Der "Kallikreinloop" sowie die dicht benachbarte Kohlehydratkette können demzufolge als Ursachen für die eigentliche Spezifität des Kallikreins diskutiert werden.

Von besonderer Bedeutung für diese Reaktivität dürfte weiterhin die Position 99 sein, in der Kallikrein einen Tyrosin-, Trypsin jedoch einen Leucinrest aufweist. Dieser Rest 99 steht im Trypsin-Inhibitor-Komplex in Wechselwirkung mit der Position P_2 des Inhibitors. Chymotrypsin zeigt in der Position 99 einen Isoleucinrest, der ebenfalls in energetisch günstiger Position zu P_2 des Peptidylchloromethylketon-Inhibitors steht (46,42). Die starke Bevorzugung eines Kallikrein-Substrates mit Phenylalanin in der Position P_2 ist möglicherweise das Ergebnis einer energetisch günstigen Wechselbeziehung zwischen den beiden aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin.

VII. Experimentelles

Reduktion und Carboxymethylierung (48,49)

Pro 1,0 ml 6 N Guanidin/HCl (p.a., Serva), 0,01% EDTA, 1,0 M Tris/HCl pH 8,6 wurden 10 bis 15 mg Kallikrein gelöst. Unter N_2 wurden pro ml dieser Lösung 25 μ l (0,35 mMol) 2-Mercaptoäthanol (reinst, Serva) zugegeben. Nach 12-18 h Inkubation unter N_2 bei Raumtemperatur wurden pro ml Lösung 65,9 mg (0,35 mMol) Jodessigsäure (p.a., Merck, zweimal frisch umkristallisiert aus Petroläther, Sdp. 40-60°C) in 0,26 ml 1,4 N NaOH zugegeben. Nach 15 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 10-20 μ l Mercaptoäthanol beendet.

Reduktion und Aminoäthylierung

Optimale Bedingungen für die Reduktion und Aminoäthylierung des Kallikreins zu finden war eine der Aufgaben der vorliegenden Arbeit. Die früher verwendete Methode ("alte Methode") wurde deshalb wie im Text detailliert erläutert, in einer Reihe von Versuchen modifiziert.

"Alte Methode" (20): Der Reduktionsansatz erfolgte wie bei Reduktion und Carboxymethylierung beschrieben mit Ausnahme der Verwendung von 0,25 M anstelle von 1,0 M Tris/HCl pH 8,6. Nach der Inkubation mit dem Reduktionsmittel wurden pro ml Lösung in drei gleichen Portionen im Abstand von je 10 min je 50 μ l (0,97 mMol) Äthylenimin (monomer, puriss., Fluka) zugefügt (insgesamt 2,91 mMol, d.h. ein 8,3facher Überschuß über 2-Mercaptoäthanol). Als günstiger (Gewinnung von chromatographisch einheitlicherem Mate-

rial) erwies sich im Laufe der Untersuchungen folgendes Verfahren:

"Neue Methode": Je ca. 10 mg Kallikrein wurden pro 1,0 ml Puffer (6 N Guanidin/HCl, 0,66 M Tris/HCl pH 8,6, 0,01% EDTA) gelöst und unter N_2 mit 20 μ l (0,28 mMol) 2-Mercaptoäthanol versetzt. Das Gemisch wurde 12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde in drei gleichen Portionen im Abstand von je 10 min je 15 μ l (insgesamt 0,87 mMol, d.h. ein dreifacher Überschuß über das Reduktionsmittel) Äthylenimin zugesetzt. Die Abtrennung der Reagentien erfolgte anschließend durch Dialyse gegen 0,1 M NH_4HCO_3 -Lösung pH 8,5 oder durch Gelfiltration im gleichen Elutionsmittel über Sephadex G-25 fine.

Bromcyanspaltung (50,51)

Zur Bromcyanspaltung wurde getrocknetes Peptidmaterial in 4,0 ml 70%iger Ameisensäure (52) aufgenommen und 1,0 ml einer 0,5 M Bromcyanlösung in 70%iger Ameisensäure zugesetzt. Nach 24 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung mit dem zehnfachen Volumen an Wasser versetzt und gefriergetrocknet.

Trypsinspaltung

Tryptische Spaltungen wurden unter Bedingungen, wie sie im einzelnen im Text erläutert sind, mit TPCK behandeltem β -Trypsin vom Rind durchgeführt, das durch Chromatographie an SE-Sephadex weiter gereinigt worden war (53).

Sonstige Spaltmethoden

Bedingungen, Reagentien und Variationen von BNPS-Skatol- und TBC-Spaltversuchen sind im Text detailliert erläutert.

Aminosäureanalysen

Bis einschließlich des in Abb.16 dargestellten Versuches wurden die Aminosäureanalysen am Beckman-Unichrom-Aminosäureanalysator durchgeführt. Die quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgte dabei mit Hilfe des Integrators CRS 110A der Firma Infotronics.

Dazu wurde Material mit ca. 10-100 nmol von jeder der zu bestimmenden Aminosäure mit 3 ml HCl 6 N (die zur Verhinderung der Oxidation von Tyrosin mit 0,2% Phenol versetzt war (54)) in evakuierten Ampullen (ca. 10^{-1} Torr) 24 h bei 110°C hydrolysiert. Anschließend wurde die Salzsäure bei ca. 37°C am Wasserstrahlvakuum entfernt.

Am Beckman-Unichrom erfolgte die Analyse aller Aminosäuren in einem einzigen Lauf an der langen Säule. CmCys wurde in diesem System unmittelbar vor Asp eluiert. Die Reihenfolge der basischen Aminosäuren war: Ammoniak, Lys, His, Hsl und Arg. Hse ließ sich bei diesem Verfahren nicht von Glu abtrennen, so daß es gemeinsam mit diesem ausgewertet werden mußte. Bei glucosaminhaltigen Proben fiel der Glucosaminpeak mit jenen von Ile und/oder Leu zusammen, so daß hierbei alle drei Werte nicht zu erfassen waren.

Für spätere Aminosäureanalysen konnte ein Gerät der Firma Durrum Verwendung finden, dessen wesentlich höhere Empfindlichkeit es erlaubte, die benötigten Aminosäuremengen um den Faktor 5 herabzusetzen.

Die Farbwerte nicht in kommerziellen Standardgemischen enthaltener Aminosäuren wurden wie folgt festgelegt: Für CmCys wurde der Farbwert zu 92,3% desjenigen von Asp bestimmt, in guter Übereinstimmung mit 91,7% nach (55). Der Farbwert von AetCys wurde zu 89,4% desjenigen von Lys bestimmt, während in der Lit.(56) hierfür 92% angegeben sind. Soweit Hse und Glu gemeinsam eluiert wurden, wurde für die Bestimmung des Gehalts an beiden Amino-

säuren ausschließlich der Farbwert von Glu verwendet. Bei der Auftrennung von Glu und Hse, wie sie der Durrumanalysator erreichte, wurde nach (56) der Farbwert von Hse mit 85% desjenigen von Leu angenommen. Entsprechend fand für Hsl ein Farbwert Verwendung, der zu 65% des Wertes von Leu bestimmt wurde.

Nach den Ergebnissen kinetischer Untersuchungen in unserem Arbeitskreis (19) wurde zur Korrektur auf Zerstörung des Threonins bei der 24 h HCl-Hydrolyse mit dem Faktor 1,039, zur Korrektur auf Zerstörung des Serins mit dem Faktor 1,091 multipliziert.

Bestimmung des Proteingehaltes

Wo nicht anders angegeben, erfolgte die Bestimmung des Proteingehaltes durch quantitative Aminosäureanalyse. Gelegentlich wurde der Proteingehalt durch die Extinktion des Materials bei 280 nm bestimmt, wenn der Gehalt an Tyrosin und Tryptophan bereits bekannt war. Dazu wurden die von Edelhoch (57) angegebenen molaren Extinktionskoeffizienten dieser beiden Aminosäuren verwendet.

Spektrophotometrische Bestimmung des Tryptophangehaltes

Umgekehrt wurde der Tryptophangehalt von Peptiden unter Verwendung dieser Extinktionskoeffizienten (57) aus der Extinktion des Materials bei 280 nm in Verbindung mit einer Proteinbestimmung durch quantitative Aminosäureanalysen ermöglicht.

Chromatographische Trennungen

Die Bedingungen für Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie sind jeweils in der Legende zu den einzelnen Abbildungen

angegeben. Die Gradienten für die Ionenaustauschchromatographie wurden mit Hilfe einer Mehrkanalschlauchpumpe erzeugt. Die Extinktion jeder einzelnen Fraktion des Eluates wurde durch die Messung am Zeiss Spektralphotometer PMQ II bestimmt. Die Fraktionen wurden anschließend wie in den Abbildungen gezeigt vereinigt.

Soweit möglich wurden flüchtige Puffer verwendet. 0,1 M NH_4HCO_3 wurde durch Gefriertrocknung entfernt. Proben, die in 50%iger Essigsäure isoliert worden waren, wurden bei ca. 37°C im Wasserstrahlvakuum zur Trockne einrotiert. Triäthylammoniumacetat (58) ließ sich sowohl aus verdünnter wässriger Lösung als auch aus Puffern mit 50%iger Essigsäure durch weitgehendes Einrotieren im Wasserstrahlvakuum bei ca. 37°C und anschließendes Evakuieren der Probe bei 37°C mit einer Ölpumpe auf ca. 10 Torr unter Kühlung der Vorlage mit Methanol/Trockeneis entfernen.

Ninhydrindetektion

Für den Nachweis von Peptiden in Säuleneluaten, die bei der UV-Extinktionsmessung nicht erfasst werden konnten, wurde die Ninhydrinreaktion (59,60) verwendet. Dazu wurden die Proben jeweils in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 110°C im Trockenschrank getrocknet. Die anschließende Hydrolyse erfolgte durch 60 min Inkubation der Proben in 100 μl 3 N NaOH im verschlossenen Eppendorf-Reaktionsgefäß mit fixiertem Deckel bei 110°C. Nach Neutralisation des Hydrolysates mit 200 μl 15%iger Essigsäure wurden 100 μl Ninhydrinreagens zugegeben und die Probe im wiederum verschlossenen Eppendorf-Reaktionsgefäß 15 min auf 110°C erhitzt. Vor der Extinktionsmessung bei 570 nm wurde die Probe mit 0,5 ml 50%igem Äthanol verdünnt.

VIII Zusammenfassung

In früheren Untersuchungen zur Primärstruktur des Kallikreins B aus Schweinepankreas konnte die Aminosäuresequenz der Reste 16 bis 127 und 175 bis 245 A (Bezifferung entsprechend Chymotrypsinogen A) geklärt werden.

Die verbleibenden 48 Aminosäuren, deren Sequenz noch zu ermitteln war, bilden eine einzige zusammenhängende Brücke zwischen der 33sten und der 82sten Position der B-Kette des Enzyms.

Durch Bromcyanspaltung sowohl der carboxymethylierten als auch der aminoäthylierten B-Kette konnte ein Bruchstück mit 76 Aminosäureresten gewonnen werden, das die gesamte unbekannte Sequenz enthielt. Da sich die tryptischen Peptide des carboxymethylierten 76-Reste-Bromcyanfragmentes als unzureichend für die Sequenzanalyse erwiesen, wurde versucht, die aminoäthylierte Form dieses Peptids für eine Spaltung durch Trypsin zu isolieren. Die Aminoäthylierung bereitete jedoch wesentlich größere Probleme, als sie die Carboxymethylierung des reduzierten Kallikreins mit sich gebracht hatte. Zunächst waren Schwierigkeiten mit der wechselnden Neigung des Materials zur Aggregation und Niederschlagsbildung zu überwinden. Dann stellte sich heraus, daß nach der Aminoäthylierung die chromatographische Heterogenität des Materials wesentlich höher war als nach der Umsetzung mit Jodessigsäure. Eine Reihe von Versuchen mit geänderten Aminoäthylierungsbedingungen erbrachte schließlich eine wesentlich gesteigerte Ausbeute an chromatographisch reinem aminoäthyliertem Bromcyanpeptid. Diese blieb jedoch immer noch ca. um den Faktor 2 unter jener des carboxymethylierten Materials.

Die tryptische Spaltung des derart gewonnenen aminoäthylierten 76-Reste-Bromcyanpeptids führte zu den gewünschten sequenatorgerech-

ten Peptiden, deren Einordnung in die Gesamtsequenz einfach durchzuführen war. Jedoch war die Endausbeute, bedingt durch unvollständige Spaltung und chromatographische Auftrennung des Materials in mehrere Fraktionen, derart gering, daß nur eine Wiederholung der Versuche mit sehr hoher Materialmenge für die Sequenatoranalyse ausgereicht hätte.

Auch die direkte tryptische Spaltung aminoäthylierter B-Kette sowie die Bromcyanspaltung intakten Kallikreins und anschließende Reduktion und Aminoäthylierung erbrachte nur eine vergleichbar niedrige Ausbeute.

Inzwischen konnte die Sequenatoranalyse an carboxymethyliertem tryptischen Peptid über den Tryptophanrest in der Position 46 der B-Kette hinaus durchgeführt werden. Da somit die Position des einzigen Tryptophanrestes des 76-Reste-Bromcyanpeptids festgelegt war, bot sich in der Spaltung dieser Tryptophanylbindung mit BNPS-Skatol ein willkommener Ausweg aus der oben skizzierten Problematik. Nach anfänglichen Schwierigkeiten mit unreinen Handelspräparaten von BNPS-Skatol ließ sich schließlich ein 41-Reste-Peptid in chromatographisch reiner Form isolieren, dessen N-terminale 36 Positionen die gesamte jetzt noch unaufgeklärte Sequenzlücke umfassten. Die Sequenzanalyse dieses Materials ermöglichte die einwandfreie Identifizierung von 31 N-terminalen Positionen; die Anordnung der verbleibenden 5 Aminosäurereste konnte wahrscheinlich gemacht werden.

Damit ergibt sich die vollständige Aminosäuresequenz des Kallikreins B aus Schweinepankreas zu:

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31
Ile-Ile-Gly-Gly-Arg-Glu-Cys-Glu-Lys-Asn-Ser-His-Pro-Trp-Gln-Val-

32 33 34 40 41 41A 41B 41C 41D 42 43 44 45 46 47 48
Ala-Ile-Tyr-His-Tyr-Ser-Ser-Phe-Gln-Cys-Gly-Gly-Val-Leu-Val-Asn-

49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64
Pro-Lys-Trp-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Lys-Asn-Asp-Asn-Tyr-Glu-

65 65A 66 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81
Val-Gly-Trp-Leu-Arg-His-Asn-Leu-Phe-Glu-Asn-Glu-Asn-Thr-Ala-Gln-
82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 95A 95B
Phe-Phe-Gly-Val-Thr-Ala-Asp-Phe-Pro-His-Pro-Gly-Phe-Asn-Leu-Ser//
95Y 95Z 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109
Ala-Asp-Gly-Lys-Asp-Tyr-Ser-His-Asp-Leu-Met-Leu-Leu-Arg-Leu-Gln-
110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125
Ser-Pro-Ala-Lys-Ile-Thr-Asp-Ala-Val-Lys-Val-Leu-Glu-Leu-Pro-Thr-
127 129 129 130 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143
Gln-Glu-Pro-Glu-Leu-Gly-Ser-Thr-Cys-Glu-Ala-Ser-Gly-Trp-Gly-Ser-
144 145 A B 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157
Ile-Glu-Pro-Gly-Pro-Asp-Asp-Phe-Glu-Phe-Pro-Asp-Glu-Ile-Gln-Cys-
158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173
Val-Gln-Leu-Thr-Leu-Leu-Gln-Asn-Thr-Phe-Cys-Ala (His, Ala, Asx, Pro,
174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 A 185 186 187 188
Asx) Lys-Val-Thr-Glu-Ser-Met-Leu-Cys-Ala-Glu-Tyr-Leu-Pro-Gly-Gly-
A 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203
Lys-Asp-Thr-Cys-Met-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-Ile-Cys-Asn-Gly-
204 205 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 A 222
Met-Trp-Gln-Gly-Ile-Thr-Ser-Trp-Gly-His-Pro-Thr-Cys-Gly-Ser-Ala-
223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238
Asn-Lys-Pro-Ser-Ile-Tyr-Thr-Lys-Leu-Ile-Phe-Tyr-Leu-Asp-Trp-Ile-
239 240 241 242 243 244 245 A
Asn-Asn-Thr-Ile-Thr-Glu-Asn-Pro

Der Vergleich mit den Aminosäuresequenzen der anderen Serinproteasen des Pankreas sowie mit der Sequenz des Thrombins erweist einen hohen Grad an Verwandtschaft mit diesen Enzymen. 34 der 232 Aminosäurepositionen (15%) sind bei allen verglichenen Sequenzen identisch. Während Kallikrein und Schweinetrypsin 41% aller Reste gemeinsam haben, beträgt die Identität des Kallikreins mit dem Rindertrypsin 39%, mit dem Haitrypsin 37%, mit den Chymotrypsinen

A und B des Rindes 33% bzw. 32%, mit der Schweineelastase ebenfalls 33% und mit dem Thrombin des Rindes 21%.

Cysteinreste in homologen Positionen lassen annehmen, daß drei Disulfidbrücken in allen verglichenen Sequenzen gleichermaßen vorkommen. Die besonders enge phylogenetische Verwandtschaft von Kallikrein und Trypsin erweist sich im Auftreten von fünf Disulfidbrücken, die beiden Enzymen gemeinsam sind.

Ähnliches gilt für die katalytische Wirkungsweise; während die für den gemeinsamen proteolytischen Mechanismus wesentlichen drei Aminosäurereste His 57, Asp 102 und Ser 195 allen verglichenen Serinproteasen eigen sind, kommt die besondere Ähnlichkeit zwischen Kallikrein und Trypsin in Asp 189 zum Ausdruck, jenem Rest, der für die Primärspezifität beider Enzyme für Substrate mit positiv geladener Seitenkette maßgebend ist.

Eine Reihe struktureller Besonderheiten jedoch zeigt deutlich, daß das Kallikrein ein eigenständiges Glied der Familie pankreatischer Serinproteasen darstellt und keineswegs als eine Art von "katalytisch spezifischerem Trypsin" betrachtet werden darf. So wird z.B. die Aktivität des Trypsins durch Ca^{++} -Ionen, gebunden an Glu 70 und Glu 80, gefördert, während beim Kallikrein in Übereinstimmung mit dem Gehalt von Arginin und Alanin in den Positionen 70 und 80 eine solche Aktivitätserhöhung nicht zu beobachten ist.

Weiterhin tritt zwar die N-terminale Aminosäure Isoleucin - wesentlich für die Ionenpaarbildung mit Asp 194 im Verlaufe der Aktivierung - in allen erwähnten Serinproteasen auf, die N-terminale Ile-Ile-Sequenz bildet jedoch einen charakteristischen Zug des Kallikreins. Auch der carboxylendständige Prolinrest ist dem Kallikrein eigentümlich. Dieser C-terminalen Aminosäure mag eine besondere Bedeutung für die Stabilität des Kallikreins gegenüber dem Abbau durch Exopeptidasen zukommen. Zur Widerstandsfähigkeit des Kalli-

kreins gegenüber proteolytischem Abbau könnte ebenfalls die dem C-Terminus mit der Fixierung an Asn 239 unmittelbar benachbarte Kohlenhydratseitenkette beitragen. Eine weitere Rolle dürften die beiden Carbohydratanteile des Kallikreins beim Transport des Enzyms durch biologische Membranen spielen.

Die Region um die Positionen 96 bis 99, die beim Trypsin in Wechselwirkung mit Substraten und Inhibitoren steht, weist beim Kallikrein deutlich eigenständige strukturelle Züge auf. Kallikrein enthält in diesem Bereich, in dem auch die Spaltstelle zwischen der A- und der B-Kette des Enzyms liegt, einen zusätzlichen "Kallikreinloop" von mindestens vier Resten. Unmittelbar benachbart dürfte, gebunden an Asn 95, die zweite Kohlenhydratseitenkette des Kallikreins die räumlichen Gegebenheiten weiterhin verändern. Im gleichen Bereich liegt auch die Position 99, in der beim Chymotrypsin Isoleucin in energetisch günstiger hydrophober Wechselwirkung mit P_2 des Chlormethylketoninhibitors steht. Kallikrein trägt in der Position 99 einen Tyrosinrest, so daß sich die starke Bevorzugung von Substraten mit einem Phenylalaninrest in P_2 zwanglos mit einer energetisch und räumlich günstigen Wechselwirkung beider aromatischen Aminosäuren erklären läßt. Genauere Informationen über die Wechselwirkung des Kallikreins mit Substraten und Inhibitoren, die ein detailliertes Verständnis der spezifischen Reaktivität dieses Enzyms erlauben, wird die Röntgenstrukturanalyse ermöglichen, für die mit der Aufklärung der Aminosäuresequenz eine wesentliche Voraussetzung geschaffen wurde.

IX Literatur

- 1 Frey, E.K., Kraut, H. und Werle, E. (1968), Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- 2 Werle, E. (1936), Klin. Wschr. 15, 848
- 3 Werle, E. (1936), Biochem. Z. 287, 235
- 4 Rocha e Silva, M., Beraldo, W.T. und Rosenfeld, G. (1949), J. Physiol. (London) 109, 488
- 5 Boissonnas, R.A., Guttman, St. und Jaquenoud, P.A. (1960), Helv. chim. Acta 43, 1349
- 6 Pierce, J.V. und Webster, M.E. (1961), Biochem. Biophys. Res. Commun. 5, 353
- 7 Werle, E., Trautschold, I. und Leysath, G. (1961), Z. physiol. Chem. 326, 174
- 8 Werle, E. (1937), Biochem. Z. 290, 129
- 9 Werle, E. (1960), in Schachter, M. (Ed.), Polypeptides which Affect Smooth Muscles and Blood Vessels, Pergamon Press, London
- 10 Fiedler, F., Hirschauer, C. und Fritz, H. (1977), Z. physiol. Chem. 358, 447
- 11 Habermann, E. und Klett, W. (1966), Biochem. Z. 346, 133

- 12 Sampaio, C., Wang, S.C. und Shaw, E. (1974), Arch. Biochem. Biophys. 165, 133
- 13 Kutzbach, C. und Schmidt-Kastner, G. (1972), Z. physiol. Chem. 353, 1099
- 14 Kutzbach, C. und Schmidt-Kastner, G. (1973) in: Haberland, G.L. und Rohen, J.W. (Eds.), Kininogenases, Schattauer-Verlag, Mainz
- 15 Fiedler, F. und Werle, E. (1976), Z. physiol. Chem. 348, 1087
- 16 Habermann, E. (1962), Z. physiol. Chem. 328, 15
- 17 Fritz, H., Eckert, I. und Werle, E. (1967), Z. physiol. Chem. 348, 1120
- 18 Fiedler, F., Hirschauer, C. und Werle, E. (1970), Z. physiol. Chem. 351, 225
- 19 Fiedler, F., Hirschauer, C. und Werle, E. (1975), Z. physiol. Chem. 356, 1879
- 20 Fiedler, F., Müller, B. und Werle, E. (1972), FEBS Lett. 24, 41
- 21 Hermodson, M.A., Ericsson, L.H., Neurath, H. und Walsh, K.S. (1973), Biochemistry 12, 3146
- 22 Werle, E. und Trautschold, I. (1963), Ann. N.Y.Acad.Sci. 104, 117
- 23 Habermann, E. (1960), Naturwissenschaften 47, 111
- 24 Fiedler, F., Müller, B. und Werle, E. (1969), Eur. J. Biochem. 10, 419
- 25 Fiedler, F., Müller, B. und Werle, E. (1971), Z. physiol. Chem. 352, 1463

- 26 Fiedler, F. (1976), in: Pisano, J.J. und Austen K.F. (Eds.): Chemistry and biology of the kallikrein-kinin-system in health and disease, S. 93, DEHW Publications No. (NIH)76-791
- 27 Fiedler, F., Hirschauer, C. und Fritz, H. (1977), Z. physiol. Chem. 358, 447
- 28 Ehret, W. (1976), Dissertation Universität München
- 29 Cole, R.D. (1976), Meth. Enzymol. 11, 315
- 30 Fontana, A., Vita, C. und Toniolo, C. (1973), FEBS Lett. 32, 139
- 31 Bursten, Y. und Patchornik, A. (1972), Biochemistry 11, 4641
- 32 Dayhoff, M.O. (1972), Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 5, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.
- 33 Hartley, B.S. (1970), Phil. Trans. Roy. Soc. London 257, 77
- 34 Blow, D.M., Birktoft, J.J. und Hartley, B.S. (1969), Nature 221, 337
- 35 Titani, K., Ericsson, L.H., Neurath, H. und Walsh, K.A. (1975), Biochemistry 14, 358
- 36 De Haen, C., Neurath, H. und Teller, D.C. (1975), J. Mol. Biol. 92, 225
- 37 Stroud, R.M. Kay, L.M. und Dickerson, R.E. (1974), J. Mol. Biol. 83, 185
- 38 Birktoft, J.J., Mathews, B.W. und Blow, D.M. (1969), Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 131
- 39 Shotton, D.M. und Hartley, B.S. (1970), Nature 225, 802

- 40 Steitz, T.A., Henderson, R. und Blow, D.M. (1969), J. Mol. Biol. 46, 337
- 41 Huber, R. und Bode, W. (1978), Accounts of Chemical Research 11, 114
- 42 Bode, W. und Schwager, P. (1975), J. Mol. Biol. 98, 693
- 43 Fritz, H., Fiedler, F., Dietl, T., Warwas, M., Truscheit, E., Kolb, H.J., Mair, G. und Tschesche, H. (1977), in: Haberland, G.L., Rohen, J.W. und Suzuki, T. (Eds.), Kininogenases, Schattauer Verlag, Mainz
- 44 Huber, R., Kuklar, D., Steigemann, W., Deisenhofer, J. und Jones, A. (1974), in: Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J. und Truscheit, E. (Eds.), Proteinase Inhibitors, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- 45 Sweet, R.M. Wright, H.T., Janin, J., Chothica, C.H. und Blow, D.M. (1974), Biochemistry 13, 4212
- 46 Segal, D.M., Powers, J.C., Cohen, G.H., Davies, D.R. und Wilcox, P.E. (1971), Biochemistry 10, 3728
- 47 Kurashi, K., Powers, J.C. und Wilcox, P.E. (1973), Biochemistry 12, 771
- 48 White, F.H., Jr. (1967), Meth. Enzymol. 11, 481
- 49 Crestfield, M.A., Moore, S. und Stein, W.H. (1963), J. Biol. Chem. 238, 622
- 50 Gross, E. und Witkop, B. (1962), J. Biol. Chem. 237, 1856
- 51 Gross, E. (1967), Meth. Enzymol. 11, 238
- 52 Steers, E., Craven, G.R. und Anfinsen, C.B. (1965), J. Biol. Chem. 210, 2478

- 53 Schroeder, P.D. und Shaw, E. (1968), J. Biol. Chem. 243, 2943
- 54 Salinkow, J., Ta-Hsiu, L., Moore, S. und Stein, W.H. (1973), J. Biol. Chem. 248, 1480
- 55 Spackman, D.H., Stein, W.H. und Moore, S. (1958), Anal. Chem. 30, 1190
- 56 Hofmann, T. (1964), Biochemistry 3, 356
- 57 Edelhoch, H. (1967), Biochemistry 6, 1948
- 58 Porath, J. (1955), Nature 175, 478
- 59 Moore, S. und Stein, W. (1954), J. Biol. Chem. 211, 907
- 60 Rudloff, V. und Braunitzer, G. (1961), Z. physiol. Chem. 323, 129

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AE	aminoäthylisiert bzw. Aminoäthyl-
AetCys	Aminoäthylcystein
Asx	Asp oder Asn
BNPS-Skatol	Brom-Anlagerungsprodukt an 2-(2-Nitrophenyl-sulfenyl)-3-Methylindol
CM	Carboxymethyl- bzw. carboxymethyliert
CmCys	Carboxymethylcystein
Dansyl	1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfo-
DEAE	Diäthylaminoäthyl-
DFP	Diisopropylfluorphosphat
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
E ₂₈₀	Extinktion bei 280 nm
Glx	Glu oder Gln
GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid
HAc	Essigsäure
Hse	Homoserin
Hsl	Homoserinlacton
mal	maleyliert
pNPGb	p-Nitrophenyl-p'-guanidinobenzoat
NKE-B-KZC 123/7 453, 440, 549	Chargenbezeichnungen von Kallikrein- präparationen

QAE	Quartäres Aminoäthyl-
SBI	Sojabohnentrypsininhibitor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Sulfopropyl-
TEA	Triäthylamin
TEAA	Triäthylammoniumacetat
TBC	2,4,6-Tribromo-4-Methyl-Cyclohexadienon
TLCK	L-1-Chlor-3-p-tosylamido-2-heptanon
TPCK	L-1-Chlor-3-p-tosylamido-4-phenyl-2-butanon
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

LEBENS LAUF

Geburt	14.11.1944 in Augsburg-Göggingen
Eltern	August Martin Ehret, Rektor a.D. Margarete Ehret, geb. Gallion
Ehe	seit 27. Mai 1970 verheiratet mit Dr. phil. Gloria Ehret, geb. Stieber, Kunsthistorikerin
Schulen	1950 - 1955 Besuch der Volksschule in Augsburg 1955 - 1964 Besuch des Realgymnasiums Augsburg mit dem Abschluß der Reifeprüfung
Wehrdienst	Nov. 1964 - Okt. 1966 Feldjägertruppe der BW, OLt d.R.
Studium	SS 67 Beginn des Studiums der Chemie, SS 69 Vor- diplom, SS 71 Diplomprüfung, SS 72 Beginn des Studiums der Humanmedizin unter Anrechnung von 2 vorklinischen Semestern, WS 72/73 naturwissenschaftliche Vorprüfung, SS 73 Physikum, SS 76 Promotion zum Dr. rer. nat. WS 77/78 Ärztliche Prüfung Gesamtes Studium an der Universität München. Seit April 78 Tätigkeit als Medizinalassistent.

